

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 39/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/12122 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 2000 (09.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/06280 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1999 (26.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 39 113.7 27. August 1998 (27.08.98) DE 198 53 066.8 17. November 1998 (17.11.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG [DE/DE]; Hugstetter Strasse 49, D-79106 Freiburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIMON, Jan [DE/DE]; Beck-erwaldstrasse 27a, D-79249 Merzhausen (DE). MARTIN, Stefan [DE/DE]; Kandelstrasse 8, D-79194 Gundelfingen (DE). TERMEER, Christian [DE/DE]; Jahnstrasse 9, D-79117 Freiburg (DE). (74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregentenstrasse 16, D-80538 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: LOW-MOLECULAR FRAGMENTS OF HYALURONIC ACID FOR THE PREPARATION OF VACCINES (54) Bezeichnung: NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE DER HYALURONSÄURE ZUR HERSTELLUNG VON IMPFSTOFFEN (57) Abstract The invention relates to the use of possibly suitably modified low-molecular hyaluronic acid fragments for the preparation of vaccines. The vaccines are especially suitable for the treatment of cancer. Surprisingly it was found that possibly suitably modified low-molecular hyaluronic acid fragments can be used both to produce mature dendritic cells and, together with antigens, peptides or carrier systems, directly as adjuvants in vaccines. Said possibly suitably modified low-molecular hyaluronic acid fragments can also be coupled to an antigen, peptide or carrier system and this coupled system can advantageously be used as a vaccine, notably for the treatment of cancer. (57) Zusammenfassung Die Erfindung offenbart die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, zur Herstellung von Impfstoffen. Die Impfstoffe sind besonders geeignet zur Bekämpfung von Krebserkrankungen. Überraschend wurde gefunden, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, sowohl zur Herstellung von ausgereiften dendritischen Zellen verwendet werden können, als auch direkt mit Antigenen oder Peptiden oder Trägersystemen als Adjuvans in Impfstoffen eingesetzt werden können. Ebenfalls möglich ist eine Kopplung der niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, mit einem Antigen, Peptid oder Trägersystem. Das gekoppelte System kann dann vorteilhaft als Impfstoff, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, eingesetzt werden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Niedermolekulare Fragmente der Hyaluronsäure zur Herstellung von Impfstoffen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von niedermolekularen Fragmenten der Hyaluronsäure in der Immuntherapie, insbesondere zur Herstellung von Zusammensetzungen, die in der Immuntherapie verwendet werden können. Solche Zusammensetzungen, die in der Immuntherapie einsetzbar sind, werden im Rahmen dieser Anmeldung allgemein als "Impfstoffe" bezeichnet.

Die Bereitstellung von dendritischen Zellen (DZ) erlangt bei der Therapie von verschiedenen Erkrankungen eine immer größer werdende Bedeutung. Mit Hilfe der dendritischen Zellen ist es möglich, hochaktive Immunmodulatoren bereitzustellen, die mit verschiedenen Antigenen, insbesondere Tumorantigenen, Viruspeptiden oder allergen wirkenden Verbindungen beladen werden können. Diese Zellen werden dann in der adoptiven Immuntherapie bei Patienten mit Tumoren, Viruserkrankungen oder Allergien eingesetzt. Es besteht daher in der adoptiven Immuntherapie ein erheblicher Bedarf an dendritischen Zellen, wobei diese dendritischen Zellen vorzugsweise über standardisierte, reproduzierbare und kostengünstige Verfahren

bereitgestellt werden sollen. Diese Verfahren müssen unter GMP-/GLP-Bedingungen durchgeführt werden können.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Erzeugung von dendritischen Zellen aus Stammzellen bekannt.

Aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut von mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) behandelten Chemotherapie-Patienten können hämatopoetische Stammzellen isoliert werden, die den Oberflächenmarker CD34 aufweisen. Diese Stammzellen werden unter Zugabe verschiedener Zytokine kultiviert und die dendritischen Zellen werden nach einer verhältnismäßig langen Kultivierungszeit erhalten.

Mittlerweile gibt es Verfahren, dendritische Zellen in großer Zahl in vitro aus Vorläuferzellen des peripheren Blutes zu generieren (J. Immunol. Med. 1996, 196: 137-51; Exp. Hematology 1997, 25: 232-36; Ann. Surgery 1997, 226: 6-16).

Eine Studie an Melanompatienten unter Verwendung von nicht ausgereiften dendritischen Zellen des Standes der Technik zeigt Ansprechraten in 5 von 16 Patienten (Nature Medicine 1998, 4: 328-32), bei allen Patienten konnten aber T-Zellen mit Spezifität für das an dendritische Zellen gekoppelte Melanomantigen induziert werden. Es besteht jedoch das Problem, daß bei zu geringer Peptidmenge oder in Hinblick auf ihre Bindungsstärke modifizierten Peptiden eine Toleranz gegen das injizierte Peptid induziert werden kann (J. Immunol. 1998, 160: 4449-56). Im Hinblick auf eine Tumorthherapie wäre die Situation fatal, statt einer Immunisierung des Patienten würde diese Situation eine Tolerisierung gegenüber den induzierten Tumorantigenen bewirken. Untersuchungen der Erfinder zeigten, daß der Effekt auch nicht durch die Injektion einer größeren Menge von dendritischen Zellen zu umgehen ist. Vielmehr ist für einen erfolgversprechenden Einsatz von dendritischen Zellen der

Grad ihrer Aktivierung bzw. Ausreifung ("Maturation") entscheidend.

Ein Verfahren zur Ausreifung von dendritischen Zellen unter Einsatz von Monocyte Conditioned Medium (MCM), Tumor necrosis factor alpha (TNF α) oder CD40-Ligation ist im Stand der Technik bekannt (J. Immunol. Methods 1996, 196: 121-135; J. Exp. Med. 1997, 185: 341-349; Blood 1998, 91: 4652-4661). Bei diesen Verfahren werden Monozyten aus peripherem Blut isoliert, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert werden. Zur vollständigen Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen müssen am Ende der Differenzierungsphase weitere Zytokine zugesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen aber verschiedene Nachteile auf. Die verhältnismäßig lange Kultivierungsdauer ist für den Einsatz in der Klinik nicht geeignet. Darüber hinaus können die hohen Kosten der Zytokine und die Chargenabhängigkeit der eingesetzten Zytokine nachteilig sein.

Bei herkömmlichen Vaccinierungen mit Antigenen oder Peptiden besteht auch ein Problem dahingehend, daß häufig die Immunantwort zu schwach ist bzw. daß, wie vorstehend erwähnt, die Herstellung von ausgereiften dendritischen Zellen, die eine verbesserte Immunantwort bewirken könnten, zu aufwendig, zu kostspielig und nicht reproduzierbar genug ist. Bei der Vaccinierung von Tumorpatienten hat sich darüberhinaus gezeigt, daß sich mit einer lokalen Antigeninjektion zwar Immunantworten auslösen lassen, diese jedoch weitgehend auf die injizierte Extremität oder sogar nur die nächste Lymphknotenstation beschränkt bleiben. Es besteht daher auch ein Bedürfnis nach einer Vaccinierungsstrategie, insbesondere für Tumorpatienten, bei denen das Antigen auch systemisch gegeben werden kann, um so eine generalisierte Immunantwort zu induzieren. Die naheliegendste Lösung dieses Problems, nämlich die Verabreichung einer intravenösen Gabe von Peptid und einem

geeigneten Adjuvans, weist den Nachteil auf, daß durch den Verdünnungseffekt im peripheren Blut das Adjuvans innerhalb kürzester Zeit unwirksam wird.

Diese Probleme können aufgrund des überraschenden Befunds gelöst werden, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente vorteilhaft auf verschiedene Art und Weise in der Immuntherapie, insbesondere zur Vaccinierung von Tumorpatienten, eingesetzt werden können.

Die vorliegende Erfindung stellt daher allgemein die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können, zur Herstellung eines Impfstoffes, insbesondere zur Vaccinierung durch subkutane (s.c.), intrakutane (i.c.) und intravenöse (i.v.) Vaccinierung, insbesondere zur Behandlung von Tumorpatienten zur Verfügung.

In einer ersten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Anreicherung von ausgereiften dendritischen Zellen zur Verfügung, das folgende Schritte umfaßt:

- a) aus Blut werden mononukleäre Zellen gewonnen,
- b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, kultiviert, um die Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Impfstoffe, die die entsprechend ausgereiften dendritischen Zellen enthalten, sowie die Verwendung der mit Hyaluronsäurefragmenten ausgereiften dendritischen Zellen zur Herstellung solcher Impfstoffe.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Impfstoffe, die niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können, als Adjuvans enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Systeme, die ein Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und daran gekoppelt ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, enthalten. In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Impfstoffe, die ein derartig mit einem Hyaluronsäurefragment modifiziertes Antigen oder Peptid enthalten.

Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Impfstoffe zur subkutanen (s.c.), intrakutanen (i.c.) oder intravenösen (i.v.) Vaccinierung insbesondere von Tumorpatienten verwendet.

Zunächst wird im folgenden die erste Ausführungsform der Erfindung, nämlich das Verfahren zur Anreicherung von ausgereiften dendritischen Zellen mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, beschrieben, sowie die entsprechenden Impfstoffe, die diese ausgereiften dendritischen Zellen enthalten.

Mononukleäre Zellen können aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten gewonnen werden, wobei in bevorzugter Ausführungsform ein Leukozytenkonzentrat über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgetrennt wird.

In dem zweiten Verfahrensschritt werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen angereichert,

bevorzugt mit Hilfe von wenigstens einem gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper. Zum Einsatz kommen können hier die Magnet-aktivierte Zell-Sortierung (MACS) oder die Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS). Eine einfachere, jedoch nicht so effiziente Methode stellt die Anreicherung über Plastikadhäsion dar.

Anschließend werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist. Gegebenenfalls können noch weitere geeignete Zytokine zugesetzt werden.

Schließlich werden die in dem Kultivierungsschritt erhaltenen Zellen mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, wobei diese Fragmente 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen. Ein Grundbaustein stellt ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung dar. Bevorzugt eingesetzt werden Hyaluronsäurefragmente mit jeweils 1 bis 10 Grundbausteinen.

Die Kultivierung der den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen erfolgt in einem Medium, das GM-CSF und IL-4 enthält, bevorzugt für eine Dauer von wenigstens 72 h bis 7 Tagen. Hieran schließt sich die Kultivierung in Schritt d) für wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten an. Die Hyaluronsäurefragmente liegen bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 50 μ g/ml und besonders bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 30 μ g/ml vor.

Die vorliegende Erfindung betrifft also in einer Ausführungsform die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten für die Ausreifung von dendritischen Zellen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können dendritische Zellen hergestellt bzw. angereichert werden. Die dendritischen Zellen sind Antigen präsentierende Zellen, die auf die Initiation der primären Immunantwort spezialisiert sind. In den verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung übernehmen sie unterschiedliche Funktionen. In dem unreifen Zustand sind die dendritischen Zellen sehr effektiv beim Prozessieren von nativen Protein-Antigenen für den MHC Klasse II-Weg. Reife dendritische Zellen sind dagegen weniger für die Aufnahme von neuen Proteinen für die Präsentation geeignet, stimulieren aber dafür viel besser die ruhenden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen hinsichtlich des Wachstums und der Differenzierung.

In vivo läuft die Reifung der dendritischen Zellen dann ab, wenn die unreifen dendritischen Zellen von den Stellen der Antigenaufnahme zu den T-Zell-Bereichen der lymphoiden Organe wandern. In vitro kann die Reifung in Kulturen von frisch isolierten dendritischen Zellen beobachtet werden. Die Reifung der dendritischen Zellen schlägt sich auch in Änderungen der Morphologie und des Phänotyps nieder. Die Charakterisierung und Differenzierung der dendritischen Zellen erfolgt üblicherweise über den Nachweis verschiedener Oberflächenmarker.

Aufgrund der natürlichen Funktionen sind die dendritischen Zellen besonders geeignet, als natürliches Adjuvans bei der Impfung und Immuntherapie, insbesondere bei der Tumorthherapie, eingesetzt zu werden. Dabei ist es für den angestrebten therapeutischen Einsatz entscheidend, ausgereifte DZ's zu verwenden, die sich nach Reinfusion in den Patienten nicht wieder zu Makrophagen-ähnlichen Vorstadien zurückdifferenzieren können.

Man geht nach derzeitigem Wissensstand davon aus, daß die dendritischen Zellen im unreifen Zustand das Antigen (beispielsweise ein Tumorantigen) aufnehmen und anschließend das Antigen prozessieren. Dabei reifen die dendritischen Zellen

und wandern zu den T-Zell-reichen Bereichen der sekundären lymphoiden Organe. Reife dendritische Zellen exprimieren in hohem Maße MHC, co-stimulierende Moleküle und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, wodurch eine Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen ermöglicht wird (T-cell clustering). Co-stimulatorische Signale werden über B7-CD28 und CD40-CD40-Liganden-Interaktionen übertragen und durch die Produktion von Zytokinen, wie IFN- α , IFN- γ und IL-12, die bekannterweise die zellulär vermittelte Immunität fördern, verstärkt.

Nach derzeitigem Wissensstand scheint es wesentlich zu sein, daß für die Induktion von primärer T-Zellantwort spezialisierte Antigen präsentierende Zellen vorhanden sind, da die Präsentation von Antigenen an T-Zellen in Abwesenheit eines zweiten Signals (Co-Stimulation) entweder das Absterben der T-Zellen oder eine Antigen-spezifische Toleranz bewirken kann.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind daher insbesondere darin zu sehen, daß die dendritischen Zellen relativ einfach bereitgestellt werden können. Außerdem müssen nur verhältnismäßig geringe Konzentrationen an kostspieligen Zytokinen eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Bereitstellung einer Zellpopulation, die ganz überwiegend aus dendritischen Zellen besteht und, die sich in einem verhältnismäßig einheitlichen (synchronen) Reifungszustand befinden. Wenn die dendritischen Zellen für die Präsentation von Antigenen eingesetzt werden sollen, können die geeigneten Antigene zu einem geeigneten Zeitpunkt zu den dendritischen Zellen zugegeben werden und die Antigene können dann von den dendritischen Zellen im Laufe des Reifungsprozesses prozessiert werden. Die Antigene können entweder als Proteine, in Form von abgetöteten Zellen oder Zellpräparationen oder auch in Form von gentechnologisch modifizierten Zellen zugegeben werden. Wenn sich die

dendritischen Zellen in dem gewünschten Zustand befinden, können sie für die Therapie verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die Bereitstellung von autologen dendritischen Zellen geeignet. Der Begriff "autolog" bedeutet, daß die Ausgangszellen einem Spender (Patienten) entnommen werden. Diese Zellen werden dann in vitro erfindungsgemäß behandelt, um dendritische Zellen zu gewinnen. Die angereicherten dendritischen Zellen werden dann gegebenenfalls nach Kontakt mit dem Antigen demselben Spender, von dem sie ursprünglich herkommen, zurückgegeben.

Alternativ hierzu kann das Verfahren auch für die Bereitstellung von "allogenen" dendritischen Zellen verwendet werden. Hierbei werden die Zellen von einem Spender oder auch aus Blutkonserven, die von Blutspendediensten erhalten werden können, hergestellt und dann an andere Empfänger zurückgegeben. Hierdurch können standardisierte dendritische Zellen bereitgestellt werden, die beispielsweise optimal mit einem Tumorantigen beladen sind. Insbesondere bei viralen Infektionen (HIV) kann so die zelluläre Immunität effektiv gesteigert werden.

Erfindungsgemäß werden zur Ausreifung der dendritischen Zellen Fragmente von Hyaluronsäure (HA), die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, eingesetzt. Die Hyaluronsäure ist ein makromolekulares Polysaccharid, das als körpereigene Substanz vor allem in der Dermis zur Wasserspeicherung dient. Hyaluronsäure wird vor allem von Keratinozyten in den basalen Schichten der Oberhaut (Epidermis) sowie von Fibroblasten des Unterhaut-Bindegewebes produziert. Hyaluronsäure findet sich auch im Glaskörper von Augen, der Synovialflüssigkeit der Gelenke und ist ein Bestandteil des Bindegewebes. Bei niedrigen Konzentrationen bildet Hyaluronsäure eine hochviskose wäßrige Lösung. Die Hyaluronsäure ist eine hochmolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 50000 Dalton und mehreren

Millionen Dalton. Der Grundbaustein der Hyaluronsäure ist ein Aminodisaccharid, das aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung besteht. Dieser Grundbaustein ist mit der nächsten Einheit β 1-4-glycosidisch verbunden. Diese unverzweigte Kette der Hyaluronsäure besteht aus etwa 2000 bis 10000 derartiger Grundeinheiten. Durch Hyaluronidasen werden β -glucosidische Bindungen hydrolysiert und die Hyaluronsäure wird so zu kleineren Bruchstücken abgebaut. Erfindungsgemäß werden bevorzugt die Hyaluronidase aus Bullenhoden oder die aus *Streptococcus hyaluronicus* isolierte Hyaluronidase verwendet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Hyaluronsäurefragmente werden bevorzugt zunächst mechanisch durch Scherkraft und/oder Ultraschall zerkleinert und anschließend erfolgt ein weiterer Abbau des Polysaccharids mit Hilfe einer geeigneten Hyaluronidase. Die gewünschten Fragmente mit bevorzugt 1 bis 50 Grundeinheiten werden anschließend durch geeignete Trennverfahren isoliert.

Die Hyaluronsäurefragmente können vor oder nach der Isolierung geeignet chemisch modifiziert werden. Eine Modifizierung nach der Isolierung ist bevorzugt. Als Modifikationen können beispielsweise Veresterung, Salzbildung, Amidierung, Reduktion einer Säuregruppe zum Aldehyden oder Alkohol oder Abspaltung einer Säuregruppe genannt werden. Bevorzugt sind Salze und Ester der Hyaluronsäurefragmente, beispielsweise Alkali- und Erdalkalisalze und C_1 - C_{10} -, bevorzugt C_1 - C_4 -Alkylester. Auch andere chemische Modifikationen sind möglich und von einem Fachmann aufgrund seines Fachwissens ohne weiteres durchführbar.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgend beschriebenen Beispiele weiter erläutert. Bei der Durchführung der Beispiele wurde besonders auf Verunreinigungen der Reagenzien mit Lipopolysacchariden (LPS) geachtet. Lipopolysaccharide sind Bestandteile aus der Zellwand Gram-

negativer Bakterien. Schon kleinste Verunreinigungen mit Lipopolysacchariden reichen aus, um Monozyten bzw. $CD14^{+}$ -Stammzellen des peripheren Blutes irreversibel zu aktivieren. Daher wurde bei den erfindungsgemäß durchgeführten Versuchen darauf geachtet, einen Schwellenwert von 0,01 ng/ml Lipopolysaccharid zu unterschreiten, der erfahrungsgemäß keinen Einfluß auf Monozyten, $CD14^{+}$ Stammzellen oder dendritische Zellen hat.

Beispiel 1: Zellisolation

a) Gewinnung von mononukleären Zellen (PBMC)

Ein Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) von einem gesunden, humanen Spender wurde über einem Dichtegradienten mit Ficoll-Hyperpaque plus (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durch Zentrifugation aufgetrennt. Die mononukleären Zellen (PBMC) lagern sich dabei in der Interphase des Gradienten ab, rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sowie neutrophile Granulozyten befinden sich unter dem Gradienten und wurden verworfen. Ficoll-Hyperpaque plus ist ein Gemisch von makromolaren Zuckern zellulärer Herkunft, ist aber vom Hersteller auf den LPS-Gehalt getestet (Endotoxin-Gehalt $>0,001$ ng/ml). Dieser Wert konnte in eigenen Tests bestätigt werden.

b) Markierung der $CD14$ -positiven Zellen

Zur weiteren Aufreinigung der Monozyten wurden die PBMC für 45 min. mit anti-CD 14-mAK inkubiert. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. MACS® (Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach) = Magnetic activated Cell sorting; Eine Methode zur Aufreinigung von Zellen über an Metallkügelchen gebundene Antikörper; Markierte Zellen bleiben in der magnetischen Säulenmatrix hängen. [PBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+} (Gibco) mit 5 mM Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) und Rinder-Serumalbumin (BSA); pH 7,2 durch Zugabe von

HCl eingestellt]. Durch Zugabe von EDTA wird das Klumpen der Zellen verhindert, was wichtig für die Aufreinigung in der Säule ist. Nun wurden die Zellen mit 50 µl Ziege-anti-Maus-IgG Microbeads unter den gleichen Bedingungen inkubiert, anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

c) Anreicherung der CD14-positiven Zellen über MACS

Die Anreicherung erfolgte bei 4°C. Die VS+@Säule wurde in den MACS-Magneten (beides Miltenyi) eingesetzt und zunächst mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen durch ein Zellsieb (30 µm Maschenweite; Miltenyi) passiert und auf die Säule aufgetragen. Die Negativfraktion aus unmarkierten Zellen, die magnetisch nicht in der Säulenmatrix festgehalten wurden, liefen durch und wurden verworfen. Die Säule wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um eine möglichst reine Positivfraktion zu erhalten. Anschließend wurde die Säule aus den Magneten genommen und die spezifisch über Microbeads in der Matrix festgehaltenen Zellen unter Druck mit 5 ml Puffer in ein steriles Röhrchen gespült. Die erhaltenen Zellen wurden in der Neubauerkammer ausgezählt. In der Regel konnten durch diese Methode aus einem Buffy-coat 3-5 x 10⁷ CD14-positive Zellen (Monozyten) gewonnen werden, mit einer Reinheit >90 %. Diese Zellen lassen sich vollständig durch Zytokinzugabe in DZ umwandeln.

Beispiel 2: Zellkultur

Die isolierten CD14-positiven Zellen wurden in 12 ml c-RPMI [(cRPMI: "RPMI 1640" (Gibco, Paisley, Schottland) mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin), alle Bestandteile enthalten weniger als 0,025 internationale Endotoxineinheiten/ml (Richtwert für Aqua ad injectabilia)] aufgenommen. Um sie zu dendritischen

Zellen (DCs) ausreifen zu lassen, wurde ihnen humanes GM-CSF für die klinische Anwendung (Leukomax 400®, Sandoz AG, Nürnberg) in einer Konzentration von 8000 Einheiten/ml Medium und IL-4 (Genzyme, Rüsselsheim, Charge auf LPS-Gehalt getestet: <0,001 ng/ml) in einer Konzentration von 500 Einheiten/ml Medium zugegeben. Dann wurde die Zellsuspension in einer Six-Well-Platte zu jeweils 2 ml auspipettiert und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am vierten Tag wurden nochmals 2 ml/well c-RPMI mit GM-CSF und IL-4 dazugegeben.

Beispiel 3: Hyaluronsäurepräparationen

a) Fraktionierung von Hyaluronsäure und Auftrennung der Fragmente

Aufgereinigte Hyaluronsäure (HA) aus Hahnenkämmen (Healon®; Pharmacia, für den klinischen Einsatz bestimmt, Endotoxin-Gehalt >0,001 ng/mg) wurde zunächst mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier) für 2 min. in größere Bruchstücke gespalten. Um diese Bruchstücke weiter zu zerkleinern, wurde ihnen Hyaluronidase (Typ I aus Rinderhoden; Sigma) zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Natriumacetat auf pH 5 eingestellt, bei 37°C für 12 Std. inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 90°C inaktiviert. Die erhaltenen Fragmente wurden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden sie in einer 1,5 m langen Glassäule auf ein Polyacrylamidgel (Bio-Gel P-10, Bio-Rad, München) geschichtet. Als Spülflüssigkeit diente Aqua bidestillata, unter der Säule nahm ein Fraktionssammler (Pharmacia) alle 20 min. die Fraktionen auf. Die Röhrchen wurden verschlossen, kühl und lichtgeschützt gelagert.

b) Detektion der Größe der Hyaluronsäurefragmente

1. *größere Bruchstücke nach Ultraschallzerkleinerung*

Sonifizierte HA wurde in einem 5 %igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Polysaccharidbanden wurden im Gel durch Färbung mit Stains-all (3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbo-cyanin; Sigma) sichtbar gemacht. Die so erhaltenen Fragmente haben eine Größe von 10.000 bis 50.000 kDa.

2. *kleine Fragmente nach zusätzlicher Hyaluronidaseverdauung*

ANTS-Markierung:

Zunächst mußten die einzelnen Proben mit dem Fluorophor ANTS markiert werden [ANTS-Lösung: 0,15 M 8-Aminonaphtalen-1,3,6-Trisulfonsäure Dinatriumsalz in Essigsäure/Wasser (3/17, v/v), durch langsames Erhitzen auf 60°C gelöst]. ANTS markiert jedes Zuckermolekül am Kettenende. Die kleinen Fragmente wurden ebenfalls mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 30 % Acrylamidgels aufgetrennt. Das Gel konnte nun unter UV-Licht (ANTS-Farbstoff) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

c) Quantitative Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration nach der Fragmentierung und Auftrennung

Es wurden von jeder Probe 0,1 ml abgenommen und im Eisbad mit 0,6 ml Färbelösung (5,2 g di-Natrium-Tetraborat in 1 l konzentrierter Schwefelsäure) gemischt. Nun wurden jeweils 0,02 ml 0,1 % Carbazol in Ethanol zugegeben, gemischt und abermals 10 min. lang gekocht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur konnte die HA-Konzentration photometrisch bei 520 nm bestimmt werden. Als Leerwert diente Aqua dest., als Standard 0,2 µM HA/ml in Aqua dest.

Beispiel 4: Zellstimulation

Zur Stimulation wurden den Zellen am vierten Tag der Kultivierung unterschiedliche HA-Fragmente in einer Konzentration von 0,025 mg/ml (25 µg/ml) Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten Lipopolysaccharide (LPS) von Escherichia coli Serotyp 0177 (Sigma).

Ergebnisse:

1) Auftrennung der erhaltenen Fragmente mittels Gelelektrophorese und ANTES-Färbung. Die erfindungsgemäß verwendeten Fragmente weisen eine Größe von 2 bis hin zu 12-fach-Zuckern auf. Die Konzentrationsmessung ergab Werte von etwa 1 mg/ml gespaltene HA. Eine weitere Aufspaltung dieser Fraktion in einzelne Zucker ist prinzipiell mittels einer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) möglich. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß besonders die kleinen Fragmente für die Stimulation verantwortlich sind.

2) Einfluß der DC-Stimulierung mittels HA-Fragmenten auf die Expression von Oberflächenmarkern.

Über die FACS Abbildungen kann die Oberflächendichte verschiedener Rezeptoren mittels Antikörper festgestellt werden. Integriert man die Fläche unter den Kurven, erhält man die sogenannte MFI (Mean fluorescence intensity). Diese Werte sind in der Tabelle 1 für verschiedene Rezeptoren aufgelistet.

Tabelle 1

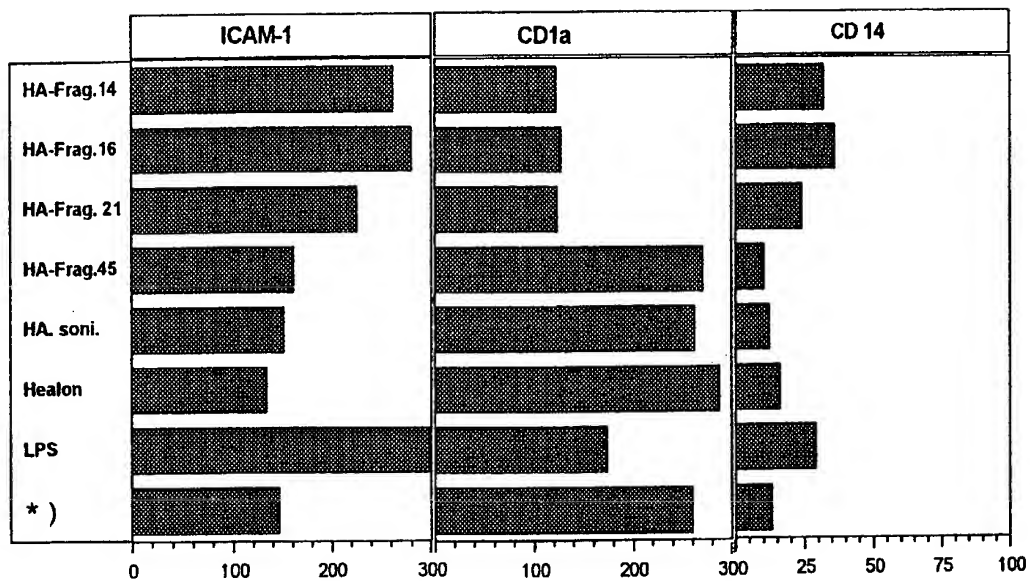
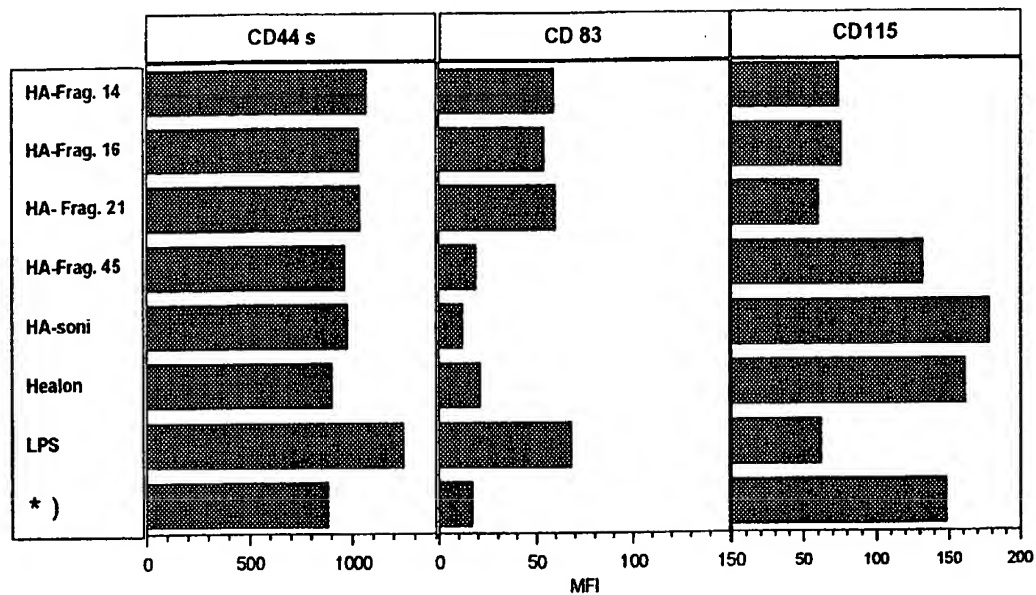


Tabelle 1 *) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Zur Bedeutung der einzelnen, in Tabelle 1 aufgeführten Oberflächenmarker:

ICAM-1 ist ein fast ubiquitär vorkommendes InterCelluläres AdhäsionsMolekül. Die Ergebnisse zeigen eine leichte Aufregulation, wie sie bei verschiedensten Arten der Zellaktivierung beobachtet wird. CD1a ist ein Marker für dendritische und Langerhanszellen der Haut; während Monozyten ausschließlich CD14 exprimieren, kommt es im Laufe der Ausreifung immer mehr zum Verlust von CD14 und Expression von CD1a. LPS, HA-Fragmente und MCM-Medium drängen diesen Prozeß wieder leicht zurück, funktionelle Konsequenzen dieser Regulation sind aber nicht bekannt.

Tabelle 2:

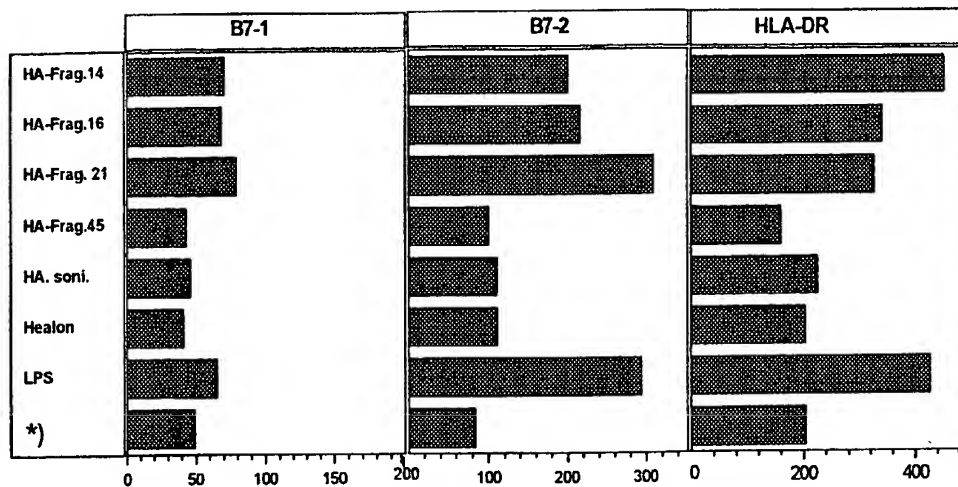


*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 2 zeigt die Stimulierung anderer Oberflächenmarker (CD44s, CD83 und CD115). Weiteres Anzeichen der DZ-Ausreifung sind eine Herunterregulation von CD115 (dem G-CSF Rezeptor) sowie eine Aufregulation von CD83, eine funktionelle Relevanz dieser Veränderungen ist noch nicht bekannt. In der Tabelle 2 ist deutlich zu sehen, daß die Kriterien der DZ-Ausreifung durch Stimulation mit kleinen HA-Fragmenten voll erfüllt werden.

CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, eine beschriebene Funktion ist die Bindung von HA.

Tabelle 3



*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 3 zeigt die Expression von weiteren Oberflächenmarkern.

Neben den Reifungsmarkern sind hier Faktoren dargestellt, die für die Funktion der Antigen Präsentation, d.h. der Stimulation von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielen. Hierzu zählen das MHC Klasse II Molekül HLA-DR sowie die beiden kostimulatorischen Faktoren B7-1 und B7-2. Ohne die Aufregulation dieser Faktoren ist auch ein Einsatz der DZ in den oben beschriebenen Anwendungen nicht sinnvoll. Erfindungsgemäß wurde eine deutliche Aufregulation aller Faktoren nach Behandlung mit HA-Fragmenten gefunden, vergleichbar mit der maximalen Stimulation nach LPS-Gabe.

Beispiel 5

Um die vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen funktionell darzustellen, wurden die DZ vorstimuliert und für 5 Tage mit aufgereinigten naiven allopathen T-Zellen inkubiert, die ebenfalls aus Leukozytenkonzentrat (buffy coats) gewonnen wurden (sog. mixed leukocyte reaction, MLR). Je nach

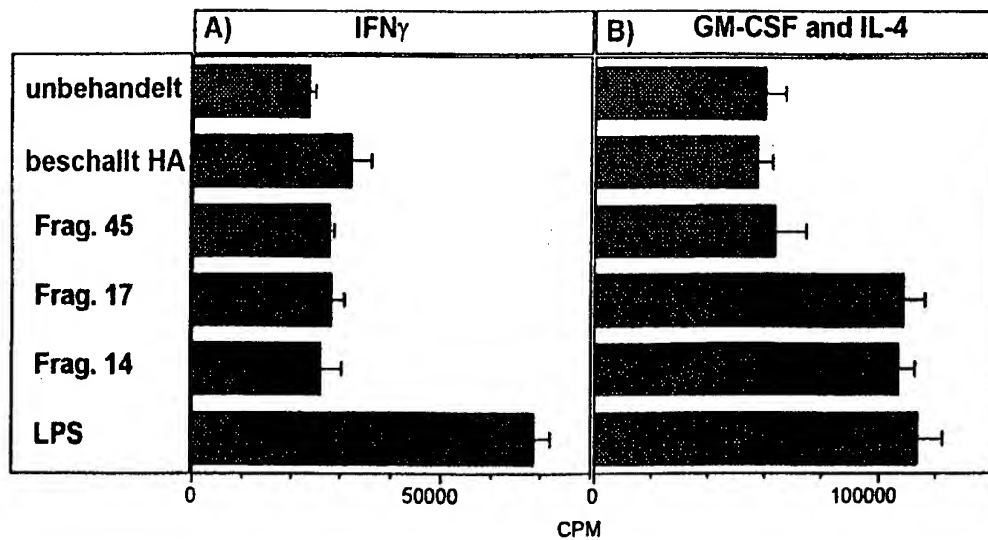
stimulatorischer Kapazität der DZ's kommt es dabei zu mehr oder weniger ausgeprägter T-Zellproliferation, die mittels Einbau von radioaktiven ^3H -Thymidin bestimmt wurde. Es wurden die radioaktiven Counts per minute (Cpm) der einzelnen Proben dargestellt, die direkt mit der stattgefundenen T-Zellproliferation korrelieren. Man sieht, daß DZ's, die mit kleinen HA-Fragmenten behandelt wurden, deutlich potentere APC's sind, vergleichbar mit dem für LPS-Stimulation erhaltenen Wert (dargestellt in Tabelle 4 B).

Auch dieses Beispiel belegt, daß erfindungsgemäß mit kleinen HA-Fragmenten zwischen 2-12 UDP-Zuckermolekülen eine deutliche Ausreifung von DC erhalten wird, die durchaus vergleichbar ist mit publizierten Daten anderer Methoden. Eine strenge Abhängigkeit von einem einzelnen Zucker erscheint unwahrscheinlich, jedoch haben größere Moleküle (20-30 UDP-Zucker) offensichtlich keinen Einfluß, da die erfindungsgemäß eingesetzten Fraktionen keine Unterschiede in der Wirkung zeigen, auch wenn sie größere Fragmente enthalten. Geschallte HA hat ebenfalls keinen Effekt.

Beispiel 6

Interessanterweise ist der erfindungsgemäße Effekt offensichtlich spezifisch für DZ's, da mit Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) behandelte Monozyten, die zu Makrophagen ausreifen, keine Steigerung ihrer stimulatorischen Kapazität nach Behandlung mit HA-Fragmenten zeigen (siehe Tabelle 4 A).

Tabelle 4



Frag. 45: In der Gelelektrophorese kein Nachweis von kleinen HA-Fragmenten, im Uronsäure-Assay weniger als 0,001 mg HA = Negativfraktion zum Ausschluß einer Wirkung von Säulenbestandteilen.

Frag. 17: In der Gelelektrophorese liegen die größten nachweisbaren Banden bei ca. 16-fach Zuckern, stark vertreten sind Zucker bis zu einer Größe von 6-fach Zucker. Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Frag. 14: Gelelektrophorese: bis ca. 22-fach Zucker, starke Banden bis 10-fach Zucker, Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Beispiel 7

In diesem Beispiel wird gezeigt, daß überraschenderweise durch niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente ausgereifte dendritische Zellen herkömmlichen dendritischen Zellen in der

Induktion einer peptidvermittelten Hapten spezifischen Immunität überlegen sind.

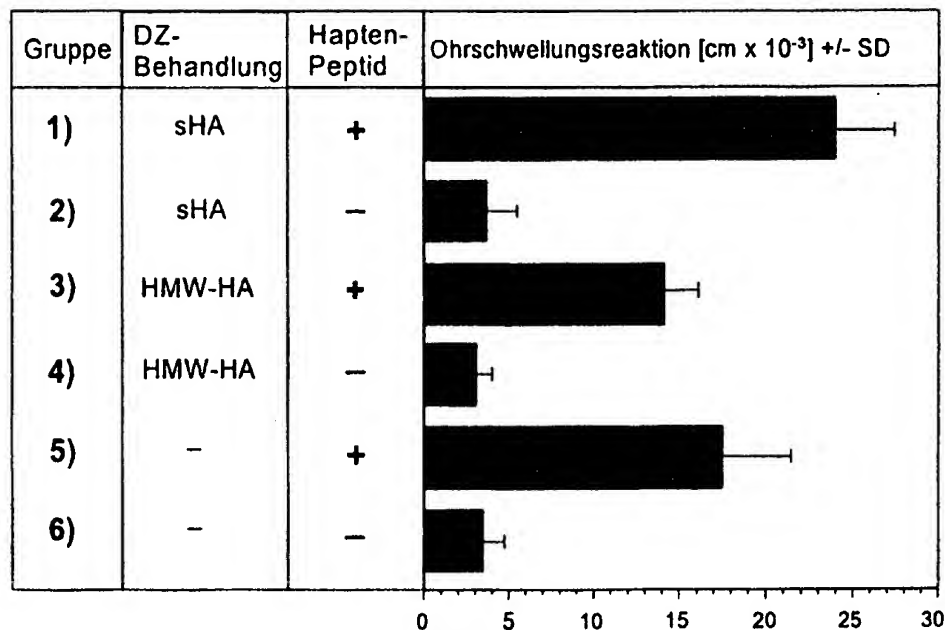
Mäusen (C57/BL6, weiblich, 6-12 Wochen, 60 Stück, 5 Mäuse pro experimentelle Gruppe, 20 g pro Maus) wurden dendritische Zellen injiziert, die zuvor mit einem synthetisch hergestellten Protein mit definierter Aminosäure-Sequenz, einem Peptid (SIINFEK*L, SIIK*FEKL; * = TNP-Lysin), behandelt wurden. Das Peptid ist so gewählt, daß es direkt mit der Antigenbindungsstelle von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche von Antigen Präsentierenden Zellen reagieren kann; das heißt, es wird unmittelbar nach der Zugabe von dendritischen Zellen auf ihrer Oberfläche präsentiert. An dieses Peptid wiederum ist das Hapten Trinitrophenyl (TNP) gekoppelt, das die antigene Determinante darstellt. Das heißt, eine T-Zelle, die über das von der dendritischen Zelle präsentierte an Trinitrophenyl gekoppelte Peptid aktiviert wird, wird reaktiv gegen Trinitrophenyl bzw. chemische Strukturhomologe des Trinitrophenyl, wie z.B. das während der weiter unten ausgeführten Auslösungsphase (Challenge) verwendete Trinitro-Chlorobenzen (TNCB). Die Stärke der Trinitrophenyl-spezifischen T-Zellreaktion richtet sich in diesem System dementsprechend nach dem Grad der dendritischen Zellaktivierung; bzw. der Effektivität mit der das an Trinitrophenyl gekoppelte Peptid von den dendritischen Zellen den T-Zellen präsentiert wird. Die Methode stellt ein anerkanntes Modell zur in vivo Untersuchung von Mechanismen dar, die während der T-Zellaktivierung eine Rolle spielen.

Entsprechende Verfahren sind beispielsweise in den Druckschriften J. Invest. Dermatol. 1998, 110: 441-48; Eur. J. Immunol. 1995, 25: 92-101 und J. Immunol. 1993, 151: 678-87 genauer beschrieben.

Die injizierten dendritischen Zellen lösen innerhalb einer Woche eine T-Zell vermittelte Immunantwort aus. Das heißt, sie

migrieren nach der Injektion in die lymphatischen Organe und lösen dort die oben beschriebene T-Zellaktivierung aus. Die Effizienz der erfolgten Immunisierung kann nach dieser Zeit anhand einer Ohrschwellungsreaktion, die durch direkte Applikation (Ohrpin selung mit einer 1%igen TNCB-Lösung) eines Trinitrophenyl-Analogons, in unserem Fall Trinitro-Chlorobenzen (TNCB), auf das Ohr quantifiziert werden. Diese Behandlung löst innerhalb von 24h eine Entzündungsreaktion aus, deren Stärke von der Anzahl der in der Haut liegenden Memory T-Zellen abhängt. Die Ohrschwellungsreaktion wird in als Dichtenzunahme des Ohres in μm gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5



In diesem System konnte eine deutliche Steigerung der Ohrschwellungsreaktion nach Vorbehandlung der dendritischen Zellen mit niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten nachgewiesen werden. Die Injektion von unbehandelten

dendritischen Zellen (Gruppe 6) löst eine kaum nachweisbare Ohrschwellungsreaktion aus, ebenso wie die alleinige Vorbehandlung mit hochmolekularer Hyaluronsäure (Gruppe 4) oder niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten (Gruppe 2). Werden die dendritischen Zellen mit Hapten-Peptid vorbehandelt (Gruppe 5), ergibt sich eine deutliche Ohrschwellungsreaktion von ca. 0,15 mm. Die T-Zellantwort läßt sich durch zusätzliche Vorbehandlung der dendritischen Zellen mit niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten signifikant verbessern und zeigt eine Ohrschwellungsreaktion von ca. 0,24 mm (Gruppe 1). Eine Vorbehandlung mit hochmolekularer Hyaluronsäure und Hapten-Peptid dagegen (Gruppe 3) zeigt keine signifikante Verbesserung gegenüber der unbehandelten Kontroll-Gruppe 5.

Beispiel 8

In diesem Beispiel wurden über ein Mausmodell mit Spezifität für das Lympho-Choriomeningitisvirus (LCMV) Vaccinierungen mit dendritischen Zellen, die mit niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten behandelt worden waren, zur Induktion einer antiviralen Immunität getestet. Das verwendete Testverfahren ist im Prinzip aus der Druckschrift J. Virol. 1998, 72: 3812-18 bekannt.

Auf gleiche Art und Weise wie in Beispiel 7 wurden dazu dendritische Zellen mit GP-33 behandelt, einem Peptid, welches für die antigene Determinante eines Oberflächen-Antigens des LCM-Virus kodiert, und der Maus intravenös injiziert. Dies bewirkt, wie zuvor geschildert, je nach Aktivierungsgrad bzw. Vorbehandlung der dendritischen Zellen eine mehr oder minder effektive Immunisierung des Tieres gegenüber LCMV. Die Effektivität der Immunisierung wurde dann nach einer Woche durch Impfung der Maus mit dem kompletten LCMV ermittelt. Eine erfolgreiche Immunisierung gegen das Virus läßt sich in Form einer klonalen Expansion von GP-33 spezifischen T-Zellen im Blut und den lymphatischen Organen der behandelten Tiere

ablesen. In einem weiteren Assay wird die Bestimmung der Virus-Last (Anzahl der Viren) im peripheren Blut bestimmt.

In einer zweiten Ausführungsform, die im folgenden beschrieben werden wird, stellt die Erfindung einen Impfstoff zur Verfügung, der zumindest ein Antigen oder Peptid enthält und ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls modifiziert sein kann, als Immunantwortverstärker (Adjuvans). Überraschend wurde gefunden, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls modifiziert sein können, vorteilhaft als Adjuvans bei der direkten Vaccinierung mit Antigenen oder Peptiden verwendet werden können.

Bei dieser Methode wird ein Impfstoff (Vaccin), der das Antigen enthält, dem Patienten subkutan (s.c.), intrakutan (i.c.) oder auch intravenös (i.v.) injiziert. Das injizierte Antigen wird von körpereigenen Antigen Präsentierenden Zellen (APZ) z.B. den dendritischen Zellen aufgenommen und in den regionalen Lymphknoten präsentiert, was eine antigenspezifische Immunantwort auslöst. Überraschend konnte gezeigt werden, daß die gleichzeitige Injektion von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können, die Immunantwort durch die Rekrutierung, Aktivierung und Reifung von APZ an der Einstichstelle verstärkt.

Die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen sind bereits bei der ersten Ausführungsform der Erfindung ausführlich beschrieben worden. Die in dieser zweiten Ausführungsform der Erfindung einsetzbaren niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen sind die gleichen wie bei der ersten Ausführungsform beschrieben. Die Herstellung erfolgt ebenfalls wie vorstehend beschrieben.

Der erfindungsgemäße Impfstoff gemäß der zweiten Ausführungsform kann im Prinzip jedes Antigen oder Peptid, das eine Immunantwort hervorrufen soll, enthalten. Die Hyaluronsäurefragmente bzw. die chemischen Modifikationen davon sind bevorzugt in der gleichen Lösung enthalten, in der auch das Antigen oder Peptid enthalten ist. Es ist aber auch möglich, das Antigen oder Peptid separat von den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten bzw. deren chemischen Modifikationen zu verabreichen. Ein Impfstoff, der sowohl das Antigen bzw. Peptid als auch das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann, enthält, enthält das Antigen bzw. Peptid in einer Konzentration von ca. 1 bis 1000 µg/ml, bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 100 µg/ml und das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment bzw. dessen chemische Modifikationen in einer Konzentration von 10 ng/ml bis 1000 µg/ml, bevorzugt in einer Konzentration von 10 µg/ml bis 100 µg/ml, z.B. 30 µg/ml. Eine geeignete tägliche Dosierung an Antigen oder Peptid beträgt z.B. 1 bis 1000 µg/Tag, bevorzugt 10 bis 100 µg/Tag und die tägliche Dosierung an den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten bzw. deren chemischen Modifikationen kann z.B. 10 ng/Tag bis 1000 µg/Tag, bevorzugt 10 µg/Tag bis 100 µg/Tag, z.B. 30 µg/Tag, betragen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können außer dem Antigen bzw. den Peptiden und den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können, noch weitere im Stand der Technik bekannte Hilfsstoffe enthalten, z.B. Freundesches Adjuvans.

Erfindungsgemäß kann die Verabreichung und Verwendung der niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen erfolgen wie es auf dem Fachgebiet üblich und dem Fachmann geläufig ist.

Das folgende Beispiel erläutert diese zweite Ausführungsform der Erfindung.

Beispiel 9

Zur Überprüfung der in vivo Wirksamkeit von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten wurde gesunden Probanden (N=3) 100 µl einer 1 mg/ml Präparation von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten (eine Grundeinheit und Fragmente mit 2 bis 20 Grundeinheiten) und als Kontrolle 100 µl isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl) an zwei aufeinander folgenden Tagen subkutan injiziert. Am Tag drei wurden Stanzbiopsien entnommen und die Präparate immunhistologisch aufgearbeitet. Schon nach 24 h zeigte sich klinisch nach subkutaner Injektion von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten eine leichte Entzündungsreaktion in Form einer diskreten Rötung um die Einstichstelle, sowie ein deutliches Infiltrat, welches überwiegend aus aktivierten "maturen" (ausgereiften) dendritischen Zellen besteht. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der immunhistologischen Präparate zusammengefaßt. Die in die Dermis infiltrierenden Zellen wurden unter dem Mikroskop unter 40-facher Vergrößerung mittels eines Raster-Okulars ausgezählt, pro Präparat wurden 3 x 12 Felder gezählt und daraus die Anzahl der infiltrierenden Zellen pro mm² errechnet. Tabelle 6 zeigt die deutliche Zunahme von infiltrierenden Zellen schon 24 h nach der Injektion von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, im Gegensatz dazu zeigt die parallel durchgeführte Kontrollinjektion keinen solchen Effekt. Die genaue Immunphänotypisierung des Infiltrats zeigt ein deutliches Überwiegen von CD1a sowie HLA-DR positiven Zellen an den niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten behandelten Stellen, das heißt die Zellen zeigen den Phänotyp von reifen dendritischen Zellen. Eine deutliche Zunahme von Lymphozyten oder einzelnen Subklassen (CD19 = B-Zellmarker, CD3 = T-Zellmarker, CD4 = T-Helferzellmarker, CD8 = markiert zytotoxische T-Zellen) ist zumindest in dem beobachteten Zeitraum nicht festzustellen.

(Tabelle 6). Im deutlichen Gegensatz zu diesem Befund zeigt das Infiltrat nach Kontroll-Injektion von isotoner Kochsalzlösung eine wesentlich homogenere Verteilung, vergleichbar mit der Verteilung der einzelnen Subklassen wie sie bei einer unspezifischen Entzündungsreaktion gefunden wird (Tabelle 6).

Tabelle 6

Beobachtungszeitraum	24 h	24 h	48 h	48 h
Agens	s-HA Frag.	0,9% NaCl	s-HA Frag.	0,9% NaCl
infiltrierende Zellen / mm ²	365	123	453	235
CD1a positiv	89%	49%	78%	42%
HLA-DR positiv	75%	34%	83%	45%
CD3 positiv	23%	44%	28%	52%
CD4 positiv	15%	26%	17%	40%
CD8 positiv	6%	8%	8%	15%
CD19 positiv	2%	1%	1%	3%

Das Beispiel belegt, daß niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente offensichtlich neben der potenten Aktivierung von dendritischen Zellen in vitro gemäß der ersten Ausführungsform der Erfindung auch eine gerichtete Immigration von aktivierten dendritischen Zellen an die Injektionsstelle in vivo hervorrufen kann. Diese dendritischen Zellen migrieren dann nach Aufnahme von koinjizierten bzw. an niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente gekoppelte Antigenen/Peptiden zu den regionalen Lymphknoten, wo sie eine spezifische T-Zell vermittelte Immunantwort induzieren können.

Im folgenden wird die dritte Ausführungsform der Erfindung beschrieben, gemäß der Impfstoffe zur Verfügung gestellt werden, die ein System enthalten, in dem die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen an ein Antigen oder Peptid gekoppelt sind. Durch diese

Ausführungsform der Erfindung wird insbesondere das Problem gelöst, daß sich mit einer lokalen Antigeninjektion zwar Immunantworten auslösen lassen, diese jedoch weitgehend auf die injizierte Extremität oder sogar nur die nächste Lymphknotenstation beschränkt bleiben. Mit den erfindungsgemäßen Impfstoffen gemäß der dritten Ausführungsform ist es möglich, das Antigen auch systemisch z.B. intravenös zu verabreichen, ohne daß das Adjuvans (die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls chemisch modifiziert sein können) durch den Verdünnungseffekt im peripheren Blut innerhalb kurzer Zeit unwirksam wird.

Die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente bzw. deren chemische Modifikationen sind die gleichen wie bereits bei der ersten Ausführungsform beschrieben und können auf die gleiche Art und Weise hergestellt werden.

Als Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, können üblicherweise in Impfstoffen, bevorzugt in Impfstoffen zur Tumorthherapie, eingesetzte Antigene oder Peptide genannt werden.

Die Art und Weise der Kopplung zwischen niedermolekularem Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann und Peptid oder Antigen, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, ist nicht besonders eingeschränkt. Bevorzugt findet die Kopplung durch chemische kovalente Bindung von Antigen oder Peptid mit dem Adjuvans (niedermolekulares Hyaluronsäurefragment oder chemische Modifikation davon) statt, oder durch den gemeinsamen Einschluß von Antigen bzw. Peptid und Adjuvans in einer Mikrosphäre, wie sie z.B. in Cancer Res. 1998, 58: 3385-90 beschrieben ist.

Besonders bevorzugt ist es, den in der Hyaluronsäuresynthese verwendeten Grundbaustein UDP- β -D-N-Acetylglucosamin an das Antigen bzw. bevorzugt an das Peptid zu koppeln. Das heißt

besonders bevorzugt ist in der dritten Ausführungsform der Erfindung das Hyaluronsäurefragment mit einer Grundeinheit. Wie vorstehend bereits erläutert, handelt es sich hierbei um ein Aminodisaccharid aus D-Gluconsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β_1 -3-glycosidischer Bindung. UDP- β -D-N-Acetylglucosamin ist kommerziell erhältlich.

Die Impfstoffe gemäß der dritten Ausführungsform der Erfindung können nach Verfahren und mit Zusatzstoffen hergestellt werden, wie sie im Stand der Technik prinzipiell bekannt sind. Wesentlich ist nur, daß die neuen Kombinationen aus Peptid oder Antigen, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und niedermolekularem Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann, verwendet werden. Es versteht sich von selbst, daß im vorliegenden Fall die chemische Modifikation des Hyaluronsäurefragments auch so gewählt sein kann, daß sich eine geeignete chemische Kopplung an das Antigen oder Peptid vorteilhaft durchführen läßt. Geeignete chemische Modifikationen und Kopplungsverfahren sind dem Fachmann im Prinzip bekannt, und beliebige Verfahren des Standes der Technik können verwendet werden.

Ein erfindungsgemäßer Impfstoff gemäß der dritten Ausführungsform der Erfindung enthält z.B. 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$, bevorzugt 10 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$ des Antigens oder Peptids, gegebenenfalls mit einem Trägersystem. Eine geeignete Tagesdosis an Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, ist z.B. 1 $\mu\text{g/Tag}$ bis 1000 $\mu\text{g/Tag}$, bevorzugt 10 $\mu\text{g/Tag}$ bis 100 $\mu\text{g/Tag}$. Ist die Kopplung zwischen Antigen oder Peptid und niedermolekularem Hyaluronsäurefragment bzw. chemischer Modifikation davon durch kovalente Bindung erfolgt, ist die Konzentration bzw. Tagesdosis des niedermolekularen Hyaluronsäurefragments bzw. von dessen chemischer Modifikation notwendigerweise gleich der entsprechenden Konzentration bzw. Tagesdosis des Antigens oder Peptids, gegebenenfalls mit einem Trägersystem. Liegt das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment,

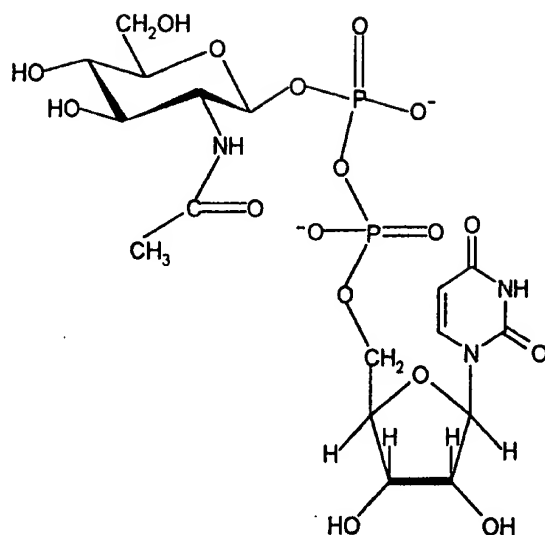
das gegebenenfalls chemisch modifiziert sein kann, und das Antigen oder Peptid nicht chemisch gebunden vor, sondern z.B. durch gemeinsamen Einschluß in einer Mikrosphäre, ist die bevorzugte Konzentration des niedermolekularen Hyaluronsäurefragments bzw. dessen chemischer Modifikation bevorzugt ebenfalls gleich der Konzentration des Antigens oder Peptids.

Mögliche Zusatzstoffe des Impfstoffes sind allgemein übliche Zusatzstoffe, z.B. Freundsches Adjuvans. Die Herstellung des Impfstoffes erfolgt auf im Stand der Technik im Prinzip bekannte Art und Weise.

Das Beispiel erläutert die dritte Ausführungsform der Erfindung.

Beispiel 8

Um eine größtmögliche Nähe von Vaccin-Peptid und Adjuvans zu erreichen, wurde das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment bzw. der in der Hyaluronsäuresynthese verwendete Grundbaustein UDP- β -D-N-Acetylglucosamin (Fragment mit einer Grundeinheit) direkt an das Peptid gekoppelt. UDP- β -D-N-Acetylglucosamin ist als Reinsubstanz bei Oxford Glucosciences erhältlich und zeigt eine ähnliche Wirkung auf dendritische Zellen wie die Hyaluronsäure-Spaltprodukte, was sowohl die benötigte Konzentration der Substanz wie auch den Grad der Aktivierung betrifft. Zur Kopplung wird die allgemein bekannte Umsetzung von Aldehyden und Aminogruppen zu Schiffchen Basen genutzt. Das Zuckermolekül liegt zu einem gewissen Prozentsatz in seiner offenkettigen Aldehyd-Form vor und geht in wäßriger Lösung die oben genannte Reaktion mit dem Protein ein.



UDP-β-D-N-Acetylglucosamin

Zur Stabilisierung des Produkts wird die Verbindung durch Zugabe von Natriumborhydrit (NaBH_3) reduziert, wodurch unter Abspaltung von Wasser eine kovalente Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom der Aldehydgruppe und dem Stickstoffatom der Aminogruppe am Peptid entsteht.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit kann die so hergestellte Verbindung entweder intra- oder subkutan in 50-100 μl isotoner Kochsalzlösung appliziert werden. Die Peptid-HA Verbindung bindet wie zuvor beschrieben an MHC-Molekülen auf der Oberfläche von Antigen Präsentierenden Zellen z.B. dendritischen Zellen und soll gleichzeitig eine Aktivierung der Zellen bewirken. Die Verabreichung kann auch intravenös erfolgen.

Bevorzugte Beispiele für Peptide gegen Tumor- und Virusantigen, die in allen erfindungsgemäßen Ausführungsformen bevorzugt sind, sind in Tabelle 7 aufgelistet:

Tabelle 7

Antigenname:	Peptidsequenz:	Targetzelle:
MELAN-1/MART-1	EAAGIGILTV	humanes Melanom
Tyrosinase	AFLPWHRLFL	humanes Melanom
GP-33	KAVYNFATM	LCM-Virus

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe gemäß allen Ausführungsformen können das Antigen oder Peptid, gegebenenfalls noch mit einem geeigneten Trägersystem, enthalten. Solche Trägersysteme sind z.B. Liposomen und Mikrosomen, die, wie im Stand der Technik bekannt ist, aus Phospholipidverbindungen hergestellt werden können.

Patentansprüche

- 1) Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, zur Herstellung eines Impfstoffes.
- 2) Verwendung nach Anspruch 1, bei der der Impfstoff zur Behandlung von Krebserkrankungen einsetzbar ist.
- 3) Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, bei der die Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, aus 1 bis 50 Grundeinheiten bestehen.
- 4) Verwendung nach Anspruch 3, bei der das Hyaluronsäurefragment UDP- β -D-N-Acetylglucosamin (Fragment aus einer Grundeinheit) ist.
- 5) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können, zur Anreicherung von dendritischen Zellen dienen, die dann als Impfstoff eingesetzt werden.
- 6) Verfahren zur Anreicherung von dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:
 - a) aus Blut werden mononucleäre Zellen gewonnen,
 - b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,

- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
 - d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten, die gegebenenfalls geeignet modifiziert sein können, kultiviert, um die irreversible Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.
- 7) Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die mononucleären Zellen aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten, insbesondere eines Ficoll-Dichtegradienten aus einem Leukozytenkonzentrat gewonnen werden.
- 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen mit Hilfe wenigstens eines gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper angereichert werden.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist.
- 10) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden, die 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen, wobei der Grundbaustein ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung ist.
- 11) Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hyaluronsäurefragmente jeweils 1 bis 10 Aminodisaccharide aufweisen.

12) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen zwischen 72 Stunden und 7 Tagen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF und IL-4 enthält.

13) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) für wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden.

14) Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß chemisch modifizierte Hyaluronsäurefragmente eingesetzt werden.

15) Angereicherte dendritische Zellen, erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 14.

16) Verwendung von angereicherten dendritischen Zellen nach Anspruch 15 zur Herstellung eines Impfstoffs.

17) Verwendung nach Anspruch 16, bei der der Impfstoff zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt wird.

18) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Impfstoff niedermolekulare Hyaluronsäurefragmente, die gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein können und ein Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, enthält.

19) Impfstoff enthaltend ein Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet chemisch modifiziert sein kann.

20) Impfstoff nach Anspruch 19, wobei der Impfstoff für die subkutane, intrakutane oder intravenöse Verabreichung hergerichtet ist.

21) Impfstoff nach Anspruch 19 oder 20, wobei der Impfstoff aus einer Formulierung besteht, die das Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem und das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, enthält.

22) Impfstoff nach Anspruch 19 oder 20, wobei der Impfstoff zwei getrennte Formulierungen umfaßt, wobei eine Formulierung das Antigen oder Peptid, gegebenenfalls mit einem Trägersystem, enthält und die andere Formulierung das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, enthält.

23) Impfstoff nach einem der Ansprüche 19 bis 22 zur Verwendung bei der Behandlung von Krebserkrankungen.

24) Impfstoff nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, aus 1 bis 50 Grundeinheiten besteht.

25) Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der Impfstoff ein System umfaßt, in dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, an ein Peptid oder Antigen gekoppelt ist.

26) System enthaltend ein niedermolekulares Hyaluronsäurefragment das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, gekoppelt mit einem Antigen oder Peptid.

27) System nach Anspruch 26, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, chemisch gebunden an das Antigen oder Peptid vorliegt.

28) System nach Anspruch 26, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann und das Peptid oder Antigen als separate Moleküle in einer Mikrosphäre vorliegen.

29) System nach einem der Ansprüche 26 bis 28, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, 1 bis 50 Grundbausteine umfaßt.

30) System nach Anspruch 29, bei dem das niedermolekulare Hyaluronsäurefragment, das gegebenenfalls geeignet modifiziert sein kann, UDP- β -D-N-Acetylglucosamin ist (Fragment aus einem Grundbaustein).

31) System nach einem der Ansprüche 26 bis 30, bei dem das Antigen oder Peptid mit einem Trägersystem vorliegt.

32) Impfstoff enthaltend ein System nach einem der Ansprüche 26 bis 31.

33) Impfstoff nach Anspruch 32 zur Behandlung von Krebserkrankungen.

Low molecular weight fragments of hyaluronic
acid for producing vaccines

The invention relates to the use of low
10 molecular weight fragments of hyaluronic acid in
immunotherapy, in particular for producing compositions
which can be used in immunotherapy. Within the context
of this application, such compositions, which can be
employed in immunotherapy, are referred to generally as
15 "vaccines".

The preparation of dendritic cells (DC) is
gaining ever increasing importance in the therapy of a
variety of diseases. The dendritic cells can be used to
prepare highly active immunomodulators which can be
20 loaded with a variety of antigens, in particular tumour
antigens, virus peptides or compounds having an
allergenic effect. These cells are then employed, in
adoptive immunotherapy, in patients with tumours or who
are suffering from virus diseases or allergies. There
25 is therefore a substantial need in adoptive
immunotherapy for dendritic cells, which are preferably
to be prepared using standardized, reproducible and
inexpensive methods. These methods have to be carried
out under GMP/GLP conditions.

30 A variety of methods for producing dendritic
cells from stem cells are known from the prior art.

Haematopoietic stem cells which possess the
CD34 surface marker can be isolated from the bone
marrow or peripheral blood of chemotherapy patients who
35 have been treated with granulocyte colony-stimulating
factor (G-CSF). These stem cells are cultured in the
added presence of a variety of cytokines and the

dendritic cells are obtained after a relatively long period of culture.

By now, methods have become available for generating dendritic cells in vitro in large numbers from precursor cells present in peripheral blood (J. Immunol. Med. 1996, 196: 137-51; Exp. Hematology 1997, 25: 232-36; Ann. Surgery 1997, 226: 6-16).

While a study carried out on melanoma patients using immature dendritic cells of the prior art shows response rates in 5 out of 16 patients (Nature Medicine 1998, 4: 328-32), it was possible to induce T cells having specificity for the melanoma antigen coupled to the dendritic cells in all the patients. However, there is the problem that tolerance to the injected peptide can be induced when the quantity of peptide is too low or when peptides have been modified with regard to their binding strength (J. Immunol. 1998, 160: 4449-56). As far as tumour therapy is concerned, this situation would be fatal; instead of immunizing the patient, this situation would cause the induced tumour antigens to be tolerated. Investigations carried out by the inventors have shown that the effect cannot be circumvented by injecting a relatively large quantity of dendritic cells, either. On the contrary, the degree of activation or maturation of the dendritic cells is a crucial factor in determining whether the use of these cells is likely to be successful.

A method for maturing dendritic cells using monocyte conditioned medium (MCM), tumour necrosis factor alpha (TNF α) or CD40 ligation is known from the prior art (J. Immunol. Methods 1996, 196: 121-135; J. Exp. Med. 1997, 185: 341-349; Blood 1998, 91: 4652-4661). In these methods, monocytes are isolated from peripheral blood and cultured with GM-CSF and IL-4. In order to complete the maturation of the cells into dendritic cells, additional cytokines have to be added at the end of the differentiation phase.

However, the methods which are known from the prior art suffer from a variety of disadvantages. The

relatively long culture period is not suitable for hospital use. In addition, the high costs of the cytokines and the batch-dependence of the cytokines employed can be disadvantageous.

5 In the case of conventional vaccinations with antigens or peptides, there is also the problem that the immune response is frequently too weak or that, as mentioned above, the preparation of mature dendritic
10 cells, which might be able to induce a better immune response, is too elaborate, too expensive and not sufficiently reproducible. In addition, it has been found, when vaccinating tumour patients, that, while immune responses can be elicited with a local antigen
15 injection, these responses remain, to a large extent, restricted to the injected limb or even only to the closest lymph node station. There is, therefore, a need for a vaccination strategy, particularly for tumour patients, in whom the antigen can also be administered systemically in order to induce a generalized immune
20 response. The most obvious solution to this problem, namely that of administering an intravenous dose of peptide and a suitable adjuvant, suffers from the disadvantage that, as a result of the dilution effect in the peripheral blood, the adjuvant becomes inactive
25 in a very short period of time.

These problems can be solved on the basis of the surprising finding that low molecular weight hyaluronic acid fragments can be employed advantageously in different ways in immunotherapy, in
30 particular for vaccinating tumour patients.

The present invention therefore makes available, in a general manner, the use of low molecular weight hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified chemically, where appropriate, for producing a
35 vaccine, in particular for vaccination by means of subcutaneous (s.c.), intracutaneous (i.c.) and intravenous (i.v.) vaccination, in particular for treating tumour patients.

In a first embodiment, the present invention

makes available a process for concentrating mature dendritic cells, which process comprises the following steps:

- a) mononuclear cells are isolated from blood,
- 5 b) cells which possess the CD14 surface marker are concentrated,
- c) the cells which possess the CD14 surface marker are cultured in a medium which contains the cytokines GM-CSF and IL-4, and
- 10 d) the cells obtained in step c) are cultured together with hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified, where appropriate, in order to induce the cells to mature into dendritic cells.

15 The invention likewise relates to vaccines which comprise the appropriately matured dendritic cells and to the use of the dendritic cells which have been matured with hyaluronic acid fragments for producing such vaccines.

20 In a further embodiment, the invention relates to vaccines which comprise low molecular weight hyaluronic acid fragments, which may be chemically modified, where appropriate, as adjuvant.

In a further embodiment, the invention relates
25 to systems which contain an antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system and, coupled to it, a low molecular weight hyaluronic acid fragment which can be suitably modified, where appropriate. In a further embodiment, the invention relates to vaccines
30 which comprise an antigen or peptide which has been modified in this way with a hyaluronic acid fragment.

Particularly preferably, the vaccines according to the invention are used for subcutaneous (s.c.), intracutaneous (i.c.) or intravenous (i.v.) vaccination,
35 tion, in particular of tumour patients.

In that which follows, the first embodiment of the invention, namely the process for concentrating mature dendritic cells with hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified, where appropriate, is

described first of all, as are the corresponding vaccines which comprise these mature dendritic cells.

Mononuclear cells can be isolated from blood using a density gradient, with a leukocyte concentrate being fractionated through a Ficoll density gradient in a preferred embodiment.

In the second step of the process, the cells possessing the CD14 surface marker are concentrated, preferably using at least one antibody which is directed against the CD14 surface marker. Magnet-activated cell sorting (MACS) or fluorescence-activated cell sorting (FACS) can be employed in this connection. A simpler, but not so efficient method is that of enrichment by means of adhesion to plastic.

The cells possessing the CD14 surface marker are then cultured in a medium which contains GM-CSF at a concentration of from 5 000 to 10 000 U/ml and IL-4 at a concentration of from 100 to 1 000 U/ml. Where appropriate, other suitable cytokines can also be added.

Finally, the cells which are obtained in the culturing step are cultured with hyaluronic acid fragments, with these fragments possessing from 1 to 50 basic building blocks of hyaluronic acid. A basic building block consists of an aminodisaccharide composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine which are linked by a β 1-3 glycosidic bond. Preference is given to using hyaluronic acid fragments which each contain from 1 to 10 basic building blocks.

The cells possessing the CD14 surface marker are cultured in a medium containing GM-CSF and IL-4, preferably for a period of from at least 72 h up to 7 days. The cells are then cultured, in step d), with hyaluronic acid fragments for at least 48 hours. The hyaluronic acid fragments are preferably present at a concentration of from 1 to 50 μ g/ml, and particularly preferably at a concentration of from 10 to 30 μ g/ml.

Consequently, the present invention relates, in

one embodiment, to the use of low molecular weight hyaluronic acid fragments for maturing dendritic cells.

The process according to the invention can be used to prepare and/or concentrate dendritic cells. The
5 dendritic cells are antigen-presenting in cells which are specialized for initiating the primary immune response. They assume different functions in the different stages of their development. In the immature state, dendritic cells are very efficient in processing
10 native protein antigens for the MHC-class II route. By comparison, mature dendritic cells are less suitable for taking up new proteins for presentation; on the other hand, they are much better at stimulating the growth and differentiation of resting CD4⁺ and CD8⁺ T
15 cells.

In vivo, maturation of the dendritic cells begins when the immature dendritic cells migrate from the sites of antigen uptake to the T cell regions of the lymphoid organs. In vitro, it is possible to
20 observe the maturation in cultures of freshly isolated dendritic cells. The maturation of the dendritic cells is also reflected in changes in morphology and phenotype. Dendritic cells are usually characterized and differentiated by detecting a variety of surface
25 markers.

Because of their natural functions, dendritic cells are particularly suitable for being used as a natural adjuvant in vaccination and immunotherapy, in particular in tumour therapy. In this connection, it is
30 of crucial importance, when the cells are being employed to achieve the sought-after therapy, to use fully matured DCs, which are unable to differentiate back, once again, into macrophage-like precursors following reinfusion into the patient.

35 According to the current state of knowledge, it is assumed that the dendritic cells take up the antigen (for example a tumour antigen) when they are in the immature state and then process the antigen. In connection with doing this, the dendritic cells mature and

migrate to the T-cell-rich regions of the secondary lymphoid organs. Mature dendritic cells express large numbers of MHC molecules, costimulatory molecules and adhesion molecules on their surfaces, which molecules enable the dendritic cells to interact with the T cells (T cell clustering). Costimulatory signals are transmitted by way of B7-CD28 and CD40-CD40-ligand interactions, and are amplified by the production of cytokines, such as IFN- α , IFN- γ and IL-12, which, as is known, promote cell-mediated immunity.

According to the current state of knowledge, it appears to be essential for specialized antigen-presenting cells to be present for inducing a primary T cell response, since presenting antigens to T cells in the absence of a second signal (costimulation) may either cause the T cells to die or produce antigen-specific tolerance.

The advantages of the process according to the invention are therefore to be seen, in particular, in the fact that the dendritic cells can be prepared relatively simply. In addition, it is only necessary to use relatively low concentrations of expensive cytokines. The process according to the invention makes it possible to prepare a cell population which consists to a very large extent of dendritic cells, with these cells being in a relatively uniform (synchronous) state of maturity. When the dendritic cells are to be used for presenting antigens, the appropriate antigens can be added to the dendritic cells at a suitable time and the antigens can then be processed by the dendritic cells during the course of the maturation process. The antigens can be added as proteins, in the form of killed cells or cell preparations, or in the form of recombinantly modified cells. When the dendritic cells are in the desired state, they can then be used for the therapy.

The process according to the invention is suitable for preparing autologous dendritic cells. The term "autologous" means that the starting cells are

taken from a donor (patient). These cells are then treated in accordance with the invention in vitro in order to obtain dendritic cells. The concentrated dendritic cells are then, where appropriate after
5 contact with the antigen, readministered to the same donor from whom they were originally derived.

Alternatively, the process can also be used for preparing "allogenic" dendritic cells. In this case, the cells are prepared from a donor, or else from
10 stored blood, which can be obtained from blood donor centres, and then readministered, in this case to other recipients. This makes it possible to prepare standardized dendritic cells which are, for example, optimally loaded with a tumour antigen. In this way, it
15 is possible to increase cellular immunity efficiently, in particular in association with viral infection (HIV).

According to the invention, fragments of hyaluronic acid (HA), which may, where appropriate, be
20 suitably modified, are employed for maturing the dendritic cells. Hyaluronic acid is a macromolecular polysaccharide which, as an endogenous substance, is used, first and foremost, in the corium for storing water. Hyaluronic acid is produced, in particular, by
25 keratinocytes in the basal layers of the epidermis and by fibroblasts present in the subcutaneous connective tissue. Hyaluronic acid is also present in the vitreous humour of the eye and in the synovial fluid of the joints and is a constituent of connective tissue. At
30 low concentrations, hyaluronic acid forms a highly viscous aqueous solution. Hyaluronic acid is a high molecular weight compound having a molecular weight of between 50 000 daltons and several million daltons. The basic building block of hyaluronic acid is an amino-
35 disaccharide which consists of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine which are linked by a β 1-3 glycosidic bond. This basic building block is linked to the next unit by a β 1-4 glycosidic bond. This unbranched hyaluronic acid chain consists of from about

2 000 to 10 000 of such basic units. Hyaluronidases hydrolyse the β -glucosidic bonds and the hyaluronic acid is in this way broken down into smaller fragments. According to the invention, preference is given to using hyaluronidase from bull testes or the hyaluronidase which is isolated from *Streptococcus hyaluronicus*. The hyaluronic acid fragments which are employed in accordance with the invention are preferably first of all comminuted mechanically by shearing forces and/or ultrasonication, after which the polysaccharides are subjected to further degradation using a suitable hyaluronidase. The desired fragments, preferably consisting of from 1 to 50 basic units, are then isolated using suitable separation methods.

The hyaluronic acid fragments can be suitably modified chemically either before or after isolation. Preference is given to modifying them after isolation. Examples of modifications which may be mentioned are esterification, salt formation, amidation, reduction of an acid group to the aldehyde or alcohol, or elimination of an acid group. Salts and esters of the hyaluronic acid fragments, for example alkali metal salts and alkaline earth metal salts, and C_1 - C_{10} -alkyl esters, preferably C_1 - C_4 -alkyl esters, are preferred. Other chemical modifications are also possible and can be effected by a skilled person, without difficulty, on the basis of his specialist knowledge.

The present invention is explained in more detail with the aid of the examples which are described below. In carrying out the examples, particular attention was paid to avoiding contamination of the reagents with lipopolysaccharides (LPS). Lipopolysaccharides are constituents of the cell walls of Gram-negative bacteria. Even the smallest contamination with lipopolysaccharides is sufficient to activate monocytes or $CD14^+$ stem cells present in the peripheral blood irreversibly. Care was therefore taken, in the experiments carried out in accordance with the invention, to keep below a threshold value of 0.01 ng of lipo-

polysaccharide/ml, below which value lipopolysaccharide has been found by experience not to have any effect on monocytes, CD14⁺ stem cells or dendritic cells.

5 Example 1: Cell isolation

a) Isolating mononuclear cells (PBMC)

A leukocyte concentrate (buffy coat) from a healthy human donor was fractionated by centrifuging it through a density gradient containing Ficoll-Hyperpaque plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Under these conditions, the mononuclear cells (PBMC) come to lie in the interphase zone of the gradient while red blood cells (erythrocytes) and neutrophilic granulocytes are to be found below the gradient, and are subsequently discarded. While Ficoll-Hyperpaque plus is a mixture of macromolecular sugars of cellular origin, its LPS content is tested by the manufacturer (endotoxin content < 0.001 ng/ml). This value was confirmed in our own tests.

20 b) Labelling the CD14-positive cells

In order to purify the monocytes still further, the PBMC were incubated for 45 min with anti-CD14 Mab. After that, they were washed with PBS and the cell pellet was resuspended in 2 ml of MACS buffer. MACS® (Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach) = magnetic-activated cell sorting; a method for purifying cells using antibodies which are bound to metal beads; labelled cells remain suspended in the magnetic column matrix. [PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ (Gibco) containing 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and bovine serum albumin (BSA); pH adjusted to 7.2 by adding HCl]. Adding EDTA prevents the cells from clumping, something which is an important prerequisite for the purification in the column. The cells were now incubated, under the same conditions, with 50 µl of goat anti-mouse IgG microbeads and then washed with MACS buffer, centrifuged and resuspended in 5 ml of MACS buffer.

c) Concentrating the CD14-positive cells using MACS

The concentration took place at 4°C. The VS+® column was inserted in the MACS magnets (both from Miltenyi) and first of all washed with 5 ml of MACS buffer. In order to obtain a single-cell suspension, the cells were passed through a cell strainer (30 µm mesh width; Miltenyi) and loaded onto the column. The negative fraction, consisting of unlabelled cells which were not retained magnetically in the column matrix, passed through and were discarded. The column was washed a further two times with 5 ml of MACS buffer on each occasion in order to obtain a positive fraction which was as pure as possible. The column was then removed from the magnets and the cells which were retained in the matrix specifically by means of microbeads were washed, under pressure and using 5 ml of buffer, into a sterile tube. The cells which were obtained were counted in a Neubauer chamber. As a rule, it was possible, using this method, to obtain $3-5 \times 10^7$ CD14-positive cells (monocytes), at a purity of > 90%, from one buffy coat. These cells can be completely converted into DC by adding cytokine.

Example 2: Cell culture

The isolated CD14-positive cells were taken up in 12 ml of c-RPMI [(cRPMI: "RPMI 1640" (Gibco, Paisley, Scotland) containing 10% heat-inactivated foetal calf serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin); all the constituents contain less than 0.025 international endotoxin unit/ml (guide value for water for injection)]. In order to allow the cells to mature into dendritic cells (DCs), human GM-CSF for clinical use (Leukoma[®] 400®, Sandoz AG, Nuremberg) and IL-4 (Genzyme, Rüsselsheim, batch tested for its LPS content: < 0.001 ng/ml) were added to them at concentrations of 8 000 units/ml of medium and 500 units/ml of medium, respectively. The cell suspension was then pipetted into a six-well plate at the rate of 2 ml per well and cultured in an incubator at 37°C and

5% CO₂. On the fourth day, a further 2 ml of c-RPMI containing GM-CSF and IL-4 were added to each well.

Example 3: Hyaluronic acid preparations

5 a) Fractionating hyaluronic acid and separating fragments

Purified cockscomb hyaluronic acid (HA) (Healon®; Pharmacia, intended for clinical use, endotoxin content < 0.001 ng/mg) was first of all
10 cleaved into relatively large fragments using an ultrasonicator (Branson Sonifier) for 2 min. Hyaluronidase (Type I from bull testes; Sigma) was then added to the fragments in order to break them down still further. The reaction solution was adjusted to
15 pH 5 with sodium acetate and incubated at 37°C for 12 hrs; the hyaluronidase was then inactivated by heating at 90°C. The resulting fragments were then separated on the basis of their size. For this, they were layered on a polyacrylamide gel (Bio-Gel P-10,
20 Bio-Rad, Munich) in a 1.5 m-long glass column. Double distilled water was used as the washing liquid, and a fraction collector (Pharmacia) below the column collected fractions every 20 min. The tubes were sealed and stored cool and protected from light.

25 b) Detecting the sizes of the hyaluronic acid fragments

1. Relatively large fragments obtained following ultrasonication size reduction

Sonicated HA was fractionated by gel
30 electrophoresis in a 5% agarose gel. The polysaccharide bands in the gel were visualized by staining with Stains-all (3,3'-diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzo-thiacarbocyanine; Sigma). The fragments obtained in this way are from 10 000 to 50 000 kDa in size.

2. Small fragments obtained following additional digestion with hyaluronidase

ANTS labelling:

First of all, the individual samples had to be labelled with the fluorophore ANTS [ANTS solution: 0.15 M 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulphonic acid disodium salt in acetic acid/water (3/17, v/v), dissolved by slowly heating to 60°C]. ANTS labels each sugar molecule at the end of the chain. The small fragments were likewise fractionated by gel electrophoresis using a 30% acrylamide gel. It was then possible to visualize the gel, and record it photographically, under UV light (ANTS dye).

c) Quantitatively determining the hyaluronic acid concentration after the fragmentation and separation

0.1 ml was withdrawn from each sample and mixed, in an icebath, with 0.6 ml of staining solution (5.2 g of disodium tetraborate in 1 l of concentrated sulphuric acid). 0.02 ml of 0.1% carbazole in ethanol was then added in each case and the reaction components were mixed and boiled again for 10 min. After the reaction mixtures had cooled down to room temperature, the HA concentration was determined photometrically at 520 nm. Distilled water was used for the blank value, while 0.2 µmol of HA/ml in distilled water was used as the standard.

Example 4: Cell stimulation

In order to stimulate the cells, different HA fragments were added to them, at a concentration of 0.025 mg/ml (25 µg/ml) of medium, on the fourth day of the culture. Lipopolysaccharides (LPS) obtained from *Escherichia coli* serotype 0177 (Sigma) were used as the positive control.

Results:

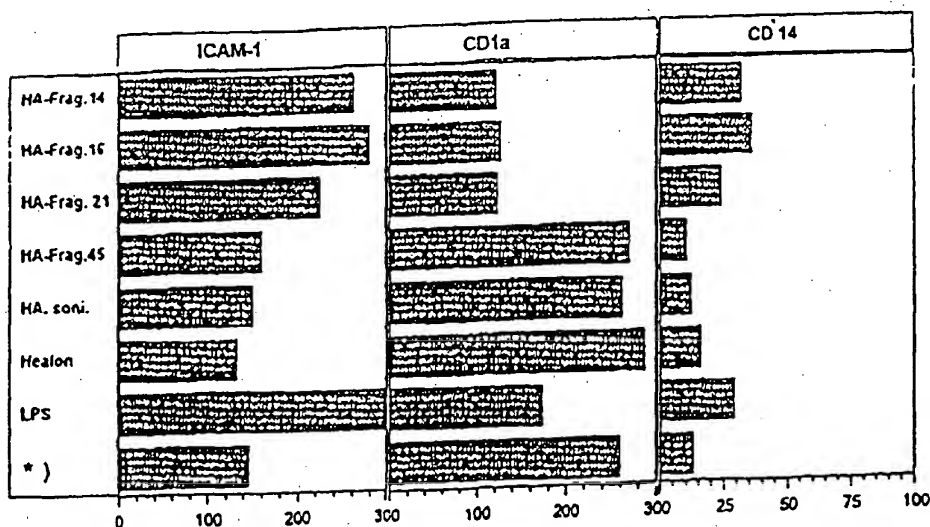
1) Separating the resulting fragments by gel electrophoresis and ANTS staining. The fragments which are used in accordance with the invention are from 2 up

to 12 sugar molecules in size. The concentration measurement gave values of about 1 mg of cleaved HA/ml. In principle, it is possible to cleave this fraction further into individual sugars by means of HPLC (high pressure liquid chromatography). The results lead to the conclusion that it is particularly the small fragments which are responsible for the stimulation.

2) Effect of the stimulation of DC by HA fragments on the expression of surface markers.

Antibodies can be used to establish the surface density of various receptors using the FACS images. Integrating the areas under the curves gives the so-called MFI (mean fluorescence intensity) value. These values are listed for various receptors in Table 1.

Table 1



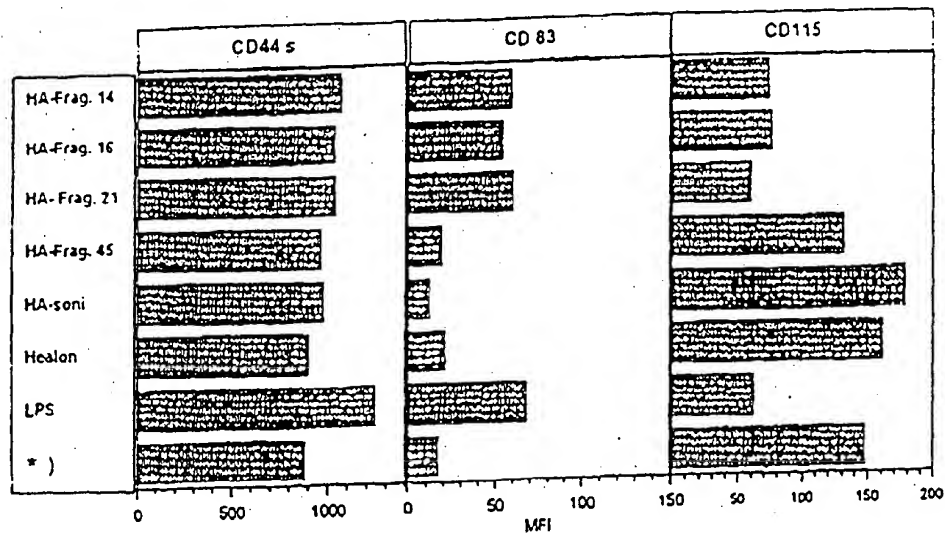
*) Untreated immature DCs, day 4

Regarding the importance of the individual surface markers cited in Table 1:

ICAM-1 is an intercellular adhesion molecule which occurs almost ubiquitously. The results show a slight up-regulation, as is observed in very many different types of cell activation. CD1a is a marker for dendritic cells and Langerhans cells of the skin;

while monocytes only express CD14, there is an ever increasing loss of CD14, and expression of CD1a, during the course of the maturation. While LPS, HA fragments and MCM medium suppress this process to a slight extent, the functional consequences of this regulation are unknown.

Table 2:



10

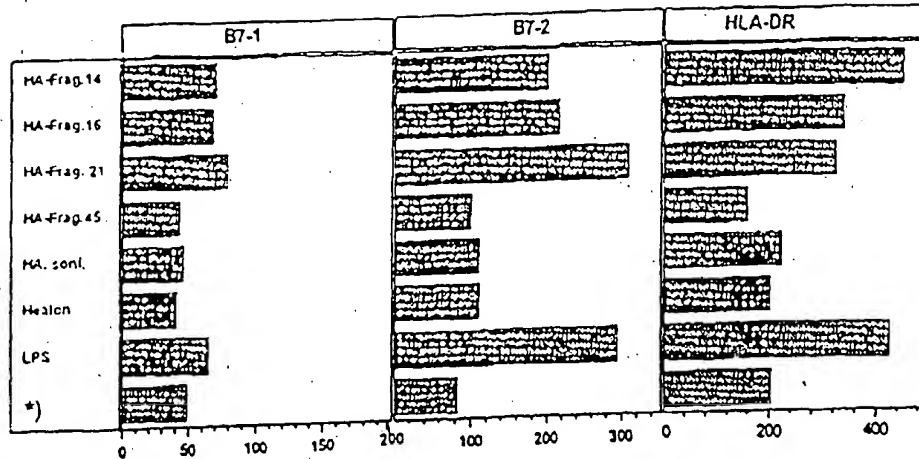
*) Untreated immature DCs, day 4

Table 2 shows the stimulation of other surface markers (CD44s, CD83 and CD115). While a further sign of DC maturation is a downregulation of CD115 (the G-CSF receptor) and an up-regulation of CD83, the functional relevance of these changes is still not known. It can be clearly seen from Table 2 that the criteria of DC maturation by stimulation with small HA fragments are fully met.

20

CD44 is an adhesion molecule, a reported function of which is that of binding HA.

Table 3



*) Untreated immature DCs, day 4

5

Table 3 shows the expression of other surface markers.

This table depicts factors, apart from maturation markers, which play a crucial role for the function of the cells in antigen presentation, i.e. in stimulating T lymphocytes. These factors include the MHC class II molecule HLA-DR and the two costimulatory factors B7-1 and B7-2. Without these factors being up-regulated, there would be no point, either, in using DCs for the above-described applications. According to the invention, a marked up-regulation of all the factors was found after treatment with HA fragments, with this up-regulation being comparable with the maximum stimulation achieved following the addition of LPS.

20

Example 5

In order to portray the increased expression of surface molecules in a functional manner, the DCs were prestimulated and then incubated for 5 days with purified, naive allogenic T cells which had likewise been obtained from leukocyte concentrate (buffy coats) (so-called mixed leukocyte reaction, MLR). Under these conditions, the T cells proliferated, as measured by the incorporation of radioactive ³H-thymidine, with

30

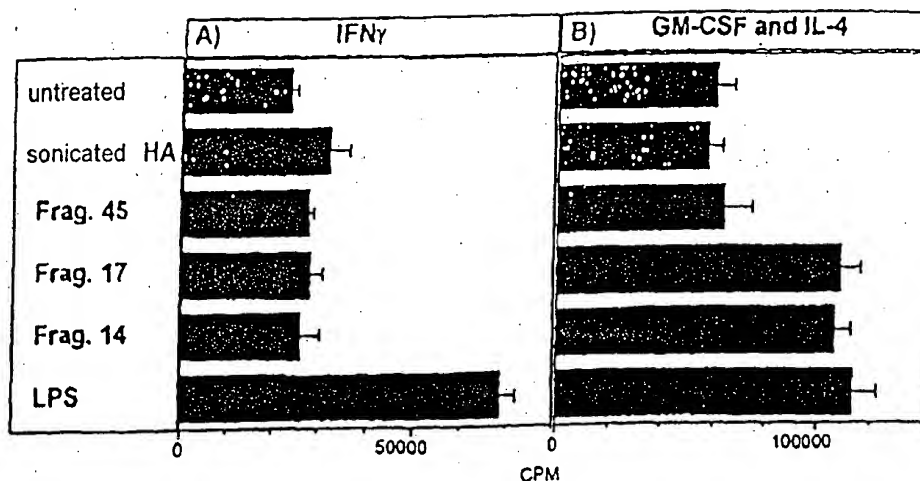
this proliferation being more or less pronounced depending on the stimulatory capacity of the DCs. The radioactive counts per minute (cpm) in the individual samples, which counts correlate directly with the T cell proliferation which occurred, are given in Table 4. It can be seen that DCs which were treated with small HA fragments are markedly more potent APCs, with the values for these DCs being comparable with that obtained for LPS stimulation (shown in Table 4 B).

This example, too, provides evidence that a marked maturation of DCs is obtained when small HA fragments, of between 2 and 12 UDP-sugar molecules, are used in accordance with the invention, with this maturation being entirely comparable with published data from other methods. While strict dependence on a single sugar appears to be unlikely, larger molecules (20-30 UDP-sugars) evidently have no influence since the fractions which are used in accordance with the invention do not exhibit any differences in their effect even when they contain larger fragments. Sonicated HA does not have any effect, either.

Example 6

Interestingly, the effect according to the invention is evidently specific for DCs, since gamma interferon (IFN γ)-treated monocytes, which mature into macrophages, do not exhibit any increase in their stimulatory capacity following treatment with HA fragments (see Table 4 A).

Table 4



- 5 Frag. 45: No detection of small HA fragments in gel electrophoresis; in the uronic acid assay, less than 0.001 mg of HA = negative fraction for excluding an effect of column constituents.
- 10 Frag. 17: In gel electrophoresis, the largest detectable bands are at approx. 16-fold sugars; sugars having a size of up to 6-fold sugars are strongly represented. Uronic acid assay: 1 mg/ml.
- 15 Frag. 14: Gel electrophoresis: up to approx. 22-fold sugars, strong bands up to 10-fold sugars; uronic acid assay: 1 mg/ml.

Example 7

20 In this example, it is shown that dendritic cells which have been matured with low molecular weight hyaluronic acid fragments are surprisingly superior to conventional dendritic cells in inducing a peptide-mediated, hapten-specific immunity.

25 Mice C57/BL6, female, 6-12 weeks, 60 animals, 5 mice per experimental group, 20 g per mouse) were injected with dendritic cells which had previously been treated with a synthetically prepared protein having a defined amino acid sequence (STINFEK*IL.

SIIK*FQKL; * = TNP lysine) peptide. The peptide is selected such that it can react directly with the MHC molecule antigen-binding site on the cell surface of antigen-presenting cells; this means that it is presented on the surface of dendritic cells immediately after they have been added. The hapten trinitrophenyl (TNP), which constitutes the antigenic determinant, is in turn coupled to this peptide. This means that a T cell which is activated by the trinitrophenyl-coupled peptide which is presented by the dendritic cell becomes reactive to trinitrophenyl or chemicals which are structurally homologous to trinitrophenyl, such as the trinitrochlorobenzene (TNCB) used during the challenge which is implemented below. Accordingly, in this system, the strength of the trinitrophenyl-specific T cell reaction depends on the degree to which the dendritic cells are activated and/or the efficiency with which the trinitrophenyl-coupled peptide is presented to the T cells by the dendritic cells. The method is a recognized model for the in-vivo investigation of mechanisms which play a role during T cell activation.

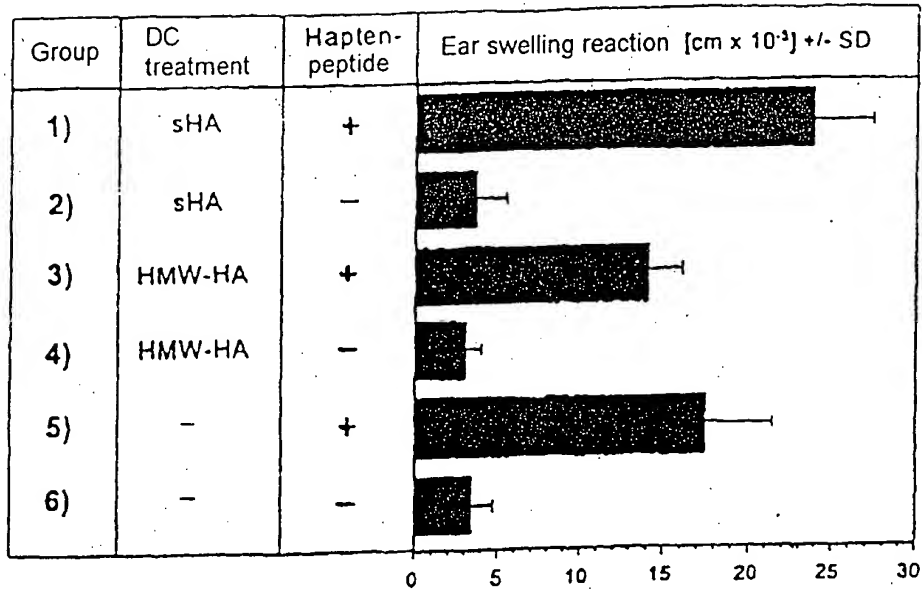
Appropriate methods are more precisely described, for example, in the publications J. Invest. Dermatol. 1998, 110: 441-48; Eur. J. Immunol. 1995, 25: 92-101 and J. Immunol. 1993, 151: 678-87.

The injected dendritic cells induce a T cell-mediated immune response within a week. That is, after having been injected, they migrate into the lymphatic organs and induce the above-described T cell activation in these organs. After this period of time, the efficiency of the immunization which has been effected can be quantified with the aid of an ear swelling reaction, which is induced by directly applying (painting the ear with a 1% solution of TNCB) a trinitrophenyl analogue, in our case trinitrochlorobenzene (TNCB) to the ear. Within 24 h, this treatment induces an inflammation reaction whose strength depends on the number of memory T cells present in the skin. The ear swelling reaction

is measured as the increase in thickness of the ear in μm . The results are summarized in Table 5 below.

Table 5

5



In this system, a marked increase in the ear swelling reaction was detected after the dendritic cells had been pretreated with low molecular weight hyaluronic acid fragments. The injection of untreated dendritic cells (group 6) scarcely induces any detectable ear swelling reaction, as is also the case when the dendritic cells are only pretreated with high molecular weight hyaluronic acid (group 4) or low molecular weight hyaluronic acid fragments (group 2). When the dendritic cells are pretreated with hapten-peptide (group 5), a marked ear swelling reaction of approx. 0.15 mm then ensues. The T cell response can be significantly improved by additionally pretreating the dendritic cells with low molecular weight hyaluronic acid fragments, and then displays an ear swelling reaction of approx. 0.24 mm (group 1). On the other hand, pretreating the dendritic cells with high molecular weight hyaluronic acid and hapten-peptide (group 3) does not result in any significant improvement as

compared with the untreated control group 5.

Example 8

In this example, vaccinations with dendritic
5 cells, which had been treated with low molecular weight
hyaluronic acid fragments, were tested for their
ability to induce antiviral immunity using a mouse
model having specificity for lymphocytic chorio-
meningitis virus (LCMV). The test method employed is
10 known in principle from the publication J. Virol. 1998,
72: 3812-18.

In the same manner as described in Example 7,
dendritic cells were treated, for this purpose, with
GP-33, a peptide which encodes the antigenic determi-
15 nant of a surface antigen of the LCM virus, and then
injected into the mouse intravenously. As previously
described, this immunizes the animal against LCMV, with
the efficiency of the immunization depending on the
degree of activation and/or the pretreatment of the
20 dendritic cells. The efficiency of the immunization was
then determined after a week by inoculating the mouse
with the complete LCMV. Successful immunization against
the virus can be deduced from a clonal expansion of
GP-33-specific T cells in the blood and the lymphatic
25 organs of the treated animals. In another assay, the
virus load (number of viruses) is determined in the
peripheral blood.

In a second embodiment, which will be described
below, the invention makes available a vaccine which
30 comprises at least one antigen or peptide and a low
molecular weight hyaluronic acid fragment, which may be
modified, where appropriate, as an immune response
amplifier (adjuvant). Surprisingly, it has been found
that low molecular weight hyaluronic acid fragments,
35 which may be modified, where appropriate, can advan-
tageously be used as an adjuvant when directly
vaccinating with antigens or peptides.

In this method, a vaccine, which comprises the
antigen, is injected into the patient subcutaneously

(s.c.), intracutaneously (i.c.) or else intravenously (i.v.). The injected antigen is taken up by endogenous antigen-presenting cells (APC), e.g. the dendritic cells, and presented in the regional lymph nodes, thereby inducing an antigen-specific immune response. Surprisingly, it was possible to show that simultaneously injecting low molecular weight hyaluronic acid fragments, which can be chemically modified, where appropriate, amplifies the immune response by recruiting, activating and maturing APC at the puncture site.

The low molecular weight hyaluronic acid fragments, or their chemical modifications, have already been described in detail in the first embodiment of the invention. The low molecular weight hyaluronic acid fragments, or their chemical modifications, which can be employed in this second embodiment of the invention are the same as those described in the first embodiment. They are likewise prepared as described above.

In principle, the novel vaccine according to the second embodiment can comprise any antigen or peptide which is to elicit an immune response. The hyaluronic acid fragments, or the chemical modifications thereof, are preferably present in the same solution in which the antigen or peptide is also present. However, it is also possible to administer the antigen or peptide separately from the low molecular weight hyaluronic acid fragments or their chemical modifications. A vaccine which comprises both the antigen or peptide and the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be chemically modified, where appropriate, comprises the antigen or peptide at a concentration of from approx. 1 to 1 000 µg/ml, preferably at a concentration of from 10 to 100 µg/ml, and the low molecular weight hyaluronic acid fragment, or its chemical modifications, at a concentration of from 10 ng/ml to 1 000 µg/ml, preferably at a concentration of from 10 µg/ml, to 100 µg/ml, e.g. 30 µg/ml. A suitable daily dose of antigen or

peptide is, for example, from 1 to 1 000 $\mu\text{g/day}$, preferably from 10 to 100 $\mu\text{g/day}$, and the daily dose of the low molecular weight hyaluronic acid fragments, or their chemical modifications, can, for example, be from 10 ng/day to 1 000 $\mu\text{g/day}$, preferably from 10 $\mu\text{g/day}$ to 100 $\mu\text{g/day}$, e.g. 30 $\mu\text{g/day}$.

Apart from the antigen or the peptides and the low molecular weight hyaluronic acid fragments, which can be chemically modified, where appropriate, the compositions according to the invention can also comprise other auxiliary substances which are known in the prior art, e.g. Freund's adjuvant.

According to the invention, the low molecular weight hyaluronic acid fragments, or their chemical modifications, can be administered and used in a manner which is customary in the field and with which the skilled person is familiar.

The following example explains this second embodiment of the invention.

Example 9

In order to test the in-vivo activity of low molecular weight hyaluronic acid fragments, healthy test subjects ($N = 3$) were injected subcutaneously with 100 μl of a 1 mg/ml preparation of low molecular weight hyaluronic acid fragments (one basic unit and fragments containing from 2 to 20 basic units) and, as control, 100 μl of isotonic sodium chloride solution (0.9% NaCl) on two consecutive days. On day three, punch biopsies were removed and the preparations were worked up immunohistologically. From the clinical point of view, a slight inflammatory reaction, in the form of a discrete reddening around the puncture site, appeared only 24 h after the subcutaneous injection of low molecular weight hyaluronic acid fragments, as did a marked infiltrate, which mainly consisted of activated, mature dendritic cells. The results obtained with the immunohistological preparations are summarized in Table 6. The cells infiltrating into the corium were

counted under the microscope, at 40 times magnification, using a grid eyepiece; 3 x 12 fields were counted per preparation and the number of infiltrating cells per mm² were calculated from this.

5 Table 6 shows the clear increase in infiltrating cells which took place only 24 h after injecting low molecular weight hyaluronic acid fragments; by contrast, the control injection, which was carried out in parallel, does not display any such effect. The

10 precise immunophenotyping of the infiltrate shows a marked preponderance of CD1a and HLA-DR-positive cells at the sites treated with low molecular weight hyaluronic acid fragments, i.e. the cells display the phenotype of mature dendritic cells. It is not possible

15 to observe any clear increase in lymphocytes or individual subclasses (CD19 = B cell marker, CD3 = T cell marker, CD4 = T helper cell marker, CD8 = labelled cytotoxic T cells) at least in the period over which the observation took place (Table 6).

20 In marked contrast to this finding, the infiltrate obtained following the control injection of isotonic sodium chloride solution shows a substantially more homogeneous distribution, which is comparable to the distribution of the individual subclasses which is

25 found in association with a non-specific inflammatory reaction (Table 6).

Table 6

Period of observation	24 h	24 h	48 h	48 h
Agent	sHA frag.	0.9% NaCl	sHA frag.	0.9% NaCl
Infiltrating cells/mm ²	365	123	453	235
CD1a-positive	89%	49%	78%	42%
HLA-DR-positive	75%	34%	83%	45%
CD3-positive	23%	44%	28%	52%
CD4-positive	15%	26%	17%	40%
CD8-positive	6%	8%	8%	15%
CD19-positive	2%	1%	1%	3%

The example provides evidence that, in addition to potentially activating dendritic cells in vitro, in accordance with the first embodiment of the invention, 5 low molecular weight hyaluronic acid fragments are evidently also able to elicit a directed immigration of activated dendritic cells to the injection site in vivo. After having taken up coinjected antigen/peptides, or antigen-peptides which are coupled 10 to low molecular weight hyaluronic acid fragments, these dendritic cells then migrate to the regional lymph nodes, where they are able to induce a specific T cell-mediated immune response.

The third embodiment of the invention, which 15 makes available vaccines which comprise a system in which the low molecular weight hyaluronic acid fragments, or their chemical modifications, are coupled to an antigen or peptide, is described below. In particular, this embodiment of the invention solves the problem that, 20 while immune responses can be induced by means of a local antigen injection, these responses remain, to a large extent, restricted to the injected limb or even only to the nearest lymph node station. When the novel vaccines according to the third embodiment are used, it 25 is also possible to administer the antigen systemically, e.g. intravenously, without the adjuvant (the low molecular weight hyaluronic acid fragments which can be chemically modified, where appropriate) becoming inactive within a short period of time due to the 30 dilution effect in the peripheral blood.

The low molecular weight hyaluronic acid fragments, or their chemical modifications, are the same as those which have already been described in the first embodiment and can be prepared in the same manner.

35 Antigens or peptides which are customarily employed in vaccines, preferably in vaccines for tumour therapy, may be mentioned as the antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system.

The nature of the coupling between the low

molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be chemically modified, where appropriate, and the peptide or antigen, where appropriate together with a carrier system, is not restricted in any particular way. Preference is given to the coupling taking place by the chemical covalent bonding of the antigen or peptide to the adjuvant (low molecular weight hyaluronic acid fragment or chemical modification thereof) or by the antigen or peptide and the adjuvant being jointly included in a microsphere, as is described, for example, in Cancer Res. 1998, 58: 3385-90.

Particular preference is given to coupling the basic building block, UDP- β -D-N-acetylglucosamine, which is used in synthesizing hyaluronic acid, to the antigen or, preferably to the peptide. This means that particular preference is given, in the third embodiment of the invention, to the hyaluronic acid fragment which contains one basic unit. As has been previously explained, the basic unit is an aminodisaccharide composed of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine which are linked by a β 1-3-glycosidic bond. UDP- β -D-N-acetylglucosamine is commercially available.

The vaccines in accordance with the third embodiment of the invention can be produced using methods and additives which are, in principle, known in the prior art. The only essential point is that use is made of the novel combinations of the peptide or antigen, where appropriate together with a carrier system, and the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be chemically modified, where appropriate. It goes without saying that, in the present case, the chemical modification of the hyaluronic acid fragment can also be selected such that a suitable chemical coupling to the antigen or peptide can be effected advantageously. Suitable chemical modifications and coupling methods are known in principle to the skilled person, and any arbitrary methods of the prior art can be used.

A novel vaccine according to the third embodi-

ment of the invention comprises, for example, from 1 µg/ml to 1 000 µg/ml, preferably from 10 µg/ml to 100 µg/ml, of the antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system. A suitable daily dose of antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system, is, for example, from 1 µg/day to 1 000 µg/day, preferably from 10 µg/day to 100 µg/day. If the coupling between the antigen or peptide and the low molecular weight hyaluronic acid fragment, or chemical modification thereof, has taken place by covalent bonding, the concentration or daily dose of the low molecular weight hyaluronic acid fragment, or of its chemical modification, is necessarily the same as the corresponding concentration or daily dose of the antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system. If the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be chemically modified, where appropriate, and the antigen or peptide are not bonded together chemically but, instead, are jointly included in a microsphere, for example, the preferred concentration of the low molecular weight hyaluronic acid fragment, or its chemical modification, is likewise preferably the same as the concentration of the antigen or peptide.

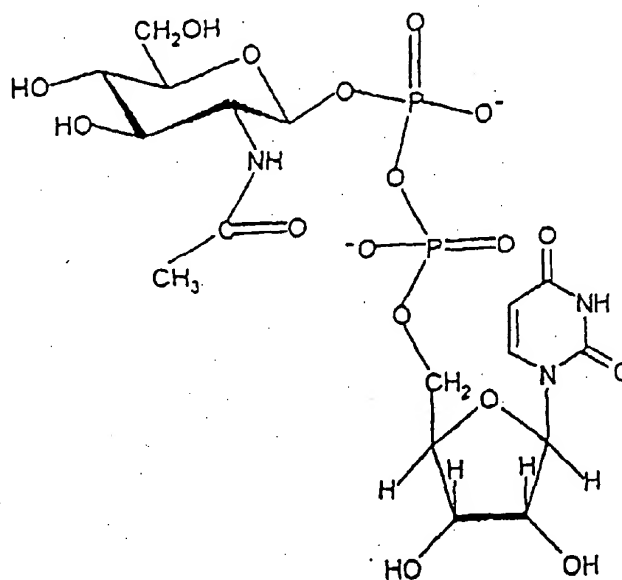
Possible additives for the vaccine are those additives which are generally customary, e.g. Freund's adjuvant. The vaccine is produced in a manner which is in principle known from the prior art.

The example explains the third embodiment of the invention.

Example 10

In order to bring the vaccine peptide and the adjuvant as close together as possible, the low molecular weight hyaluronic acid fragment, or the basic building block, UDP-β-D-N-acetylglucosamine used in the hyaluronic acid synthesis (fragment containing one basic unit) was coupled directly to the peptide. UDP-β-D-N-Acetylglucosamine can be obtained as a pure

substance from Oxford Glucosciences and exhibits an effect on dendritic cells which is similar to that exhibited by hyaluronic acid cleavage products both as regards the required concentration of the substance and as regards the degree of activation. The well-known conversion of aldehydes and amino groups to Schiff's bases is used for the coupling. A certain percentage of the sugar molecule is present in its open-chain aldehyde form and enters into the abovementioned reaction with the protein in aqueous solution.



UDP- β -D-N-Acetylglucosamine

In order to stabilize the product, the compound is reduced by adding sodium borohydride (NaBH_4), thereby forming, with the elimination of water, a covalent bond between the carbon atom of the aldehyde group and the nitrogen atom of the amino group on the peptide.

In order to check its activity, the compound which has been prepared in this way can be administered either intracutaneously or subcutaneously in 50-100 μl of isotonic sodium chloride solution. As previously described, the peptide-HA compound binds to MHC molecules on the surface of antigen-presenting cells,

e.g. dendritic cells, and should simultaneously activate the cells. The compound can also be administered intravenously.

5 Preferred examples of peptides against tumour antigen or virus antigen, which peptides are preferred in all the embodiments according to the invention, are listed in Table 7:

Table 7

10

Antigen name:	Peptide sequence:	Target cell:
MELAN-1/MART-1	EAAGIGILTV	human melanoma
Tyrosinase	AFLPWHLFL	human melanoma
GP-33	KAVYNFATM	LCM virus

15 The novel vaccines according to all the embodiments can comprise the antigen or peptide, where appropriate together with a suitable carrier system as well. Examples of these carrier systems are liposomes and microsomes, which, as is known from the prior art, can be prepared from phospholipid compounds.

Albert Ludwigs University
Clinical Centre, Freiburg

Patent Claims

- 1) Use of low molecular weight hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified, where appropriate, for producing a vaccine.
- 2) Use according to Claim 1, in which the vaccine can be used for treating cancer diseases.
- 3) Use according to Claim 1 or 2, in which the hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified, where appropriate, consist of from 1 to 50 basic units.
- 4) Use according to Claim 3, in which the hyaluronic acid fragment is UDP- β -D-N-acetylglucosamine (fragment from one basic unit).
- 5) Use according to one of Claims 1 to 4, wherein the low molecular weight hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified chemically, where appropriate, are used for concentrating dendritic cells which are then employed as the vaccine.
- 6) Process for concentrating dendritic cells, which comprises the following steps:
 - a) mononuclear cells are isolated from blood,
 - b) cells which possess the CD14 surface marker are concentrated,
 - c) the cells which possess the CD14 surface marker are cultured in a medium which contains the cytokines GM-CSF and IL-4, and
 - d) the cells obtained in step c) are cultured together with hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified, where appropriate, in order to cause the cells to mature irreversibly into dendritic cells.
- 7) Process according to Claim 6, characterized in that the blood mononuclear cells are isolated from a leukocyte concentrate using a density gradient, in particular a Ficoll density gradient.
- 8) Process according to Claim 6 or 7, charac-

terized in that the cells possessing the CD14 surface marker are concentrated using at least one antibody which is directed against the CD14 surface marker.

9) Process according to one of Claims 6 to 8, characterized in that the cells possessing the CD14 surface marker are cultured in a medium which contains GM-CSF at a concentration of from 5 000 to 10 000 U/ml and IL-4 at a concentration of from 100 to 1 000 U/ml.

10) Process according to one of Claims 6 to 9, characterized in that the cells in step d) are cultured together with hyaluronic acid fragments which contain from 1 to 50 hyaluronic acid basic building blocks, with the basic building block being an amino-disaccharide consisting of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine which are linked by a β 1-3 glycosidic bond.

11) Process according to Claim 10, characterized in that the hyaluronic acid fragments each contain from 1 to 10 aminodisaccharides.

12) Process according to one of Claims 6 to 11, characterized in that the cells possessing the CD14 surface marker are cultured, for between 72 hours and 7 days, in a medium containing GM-CSF and IL-4.

13) Process according to one of Claims 6 to 12, characterized in that the cells in step d) are cultured together with hyaluronic acid fragments for at least 48 hours.

14) Process according to one of Claims 6 to 13, characterized in that chemically modified hyaluronic acid fragments are used.

15) Enriched dendritic cells, obtainable by a process according to one of Claims 6 to 14.

16) Use of enriched dendritic cells according to Claim 15 for producing a vaccine.

17) Use according to Claim 16, in which the vaccine is used for treating cancer diseases.

18) Use according to one of Claims 1 to 4, wherein the vaccine comprises low molecular weight hyaluronic acid fragments, which can be suitably modified

chemically, where appropriate, and an antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system.

19) Vaccine comprising an antigen or peptide, where
5 appropriate together with a carrier system and a low molecular weight hyaluronic acid fragment which can be suitably modified chemically, where appropriate.

20) Vaccine according to Claim 19, wherein the vaccine is prepared for subcutaneous, intracutaneous or
10 intravenous administration.

21) Vaccine according to Claim 19 or 20, wherein the vaccine consists of a formulation which comprises the antigen or peptide, where appropriate together with a carrier system, and the low molecular weight
15 hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate.

22) Vaccine according to Claim 19 or 20, wherein the vaccine comprises two separate formulations, with one formulation comprising the antigen or peptide,
20 where appropriate together with a carrier system, and the other formulation comprising the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate.

23) Vaccine according to one of Claims 19 to 22 for
25 use in treating cancer diseases.

24) Vaccine according to one of Claims 19 to 23 wherein the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, consists of from 1 to 50 basic units.

30 25) Use according to one of Claims 1 to 4, wherein the vaccine comprises a system in which the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, is coupled to a peptide or antigen.

35 26) System comprising a low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, coupled to an antigen or peptide.

27) System according to Claim 26, in which the low

molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, is chemically bonded to the antigen or peptide.

28) System according to Claim 26, in which the low
5 molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, and the peptide or antigen are present as separate molecules in a microsphere.

29) System according to one of Claims 26 to 28, in
10 which the low molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, comprises from 1 to 50 basic building blocks.

30) System according to Claim 29, in which the low
15 molecular weight hyaluronic acid fragment, which can be suitably modified, where appropriate, is UDP- β -D-N-acetylglucosamine (fragment from one basic building block).

31) System according to one of Claims 26 to 30, in
20 which the antigen or peptide is present together with a carrier system.

32) Vaccine comprising a system according to one of Claims 26 to 31.

33) Vaccine according to Claim 32 for treating
25 cancer diseases.